

## 転写因子Klf5は初期胚発生においてFgf-ERK経路の抑制により多能性幹細胞の発生を保障する

著者	浅見 拓哉
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7839号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00143948">http://hdl.handle.net/2241/00143948</a>



筑 波 大 学

博 士 (医学) 学 位 論 文

転写因子 *Klf5* は初期胚発生において  
Fgf-ERK 経路の抑制により  
多能性幹細胞の発生を保障する

2015

筑波大学大学院人間総合科学研究科  
浅見 拓哉

## 目次

要旨	3
<b>1. 序論</b>	
1-1. マウス初期胚発生過程	4
1-2. 多能性幹細胞における未分化性維持機構	6
1-3. <i>Klf</i> ファミリー転写因子	7
<b>2. 研究目的</b>	9
<b>3. 材料と方法</b>	
3-1. <i>Klf5</i> KO マウスおよび <i>Klf5</i> 過剰発現マウスの作製	10
3-2. 胚操作と胚培養	10
3-3. マウス初期胚の遺伝子型判定	11
3-4. 免疫染色	12
3-5. BrdU 染色	12
3-6. TUNEL 染色	12
3-7. 共焦点レーザー顕微鏡による解析	13
3-8. 内部細胞塊からの ES 細胞の樹立	13
3-9. 初期胚由来 RNA からの cDNA 増幅	14
3-10. マイクロアレイ解析	14
3-11. リアルタイム RT-PCR	14
3-12. マウス ES 細胞、EpiSCs の培養とトランスフェクション	14
3-13. フローサイトメトリー解析	15
3-14. ウェスタンブロッティング解析	15
3-15. クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析	16
3-16. ChIP-sequencing (ChIP-seq) データ解析	16
3-17. 統計解析	16

## 4. 結果

4-1. <i>Klf5</i> KO 胚では Fgf-ERK 経路が亢進している	17
4-2. <i>Klf5</i> は Epi/PrE 系列の分化バランスを制御している	19
4-3. <i>Klf5</i> KO 胚における Fgf-ERK 経路の阻害は Epi への分化をレスキューする	23
4-4. E3.0 における <i>Klf5</i> と <i>Fgf4</i> の発現の相関	25
4-5. <i>Klf5</i> KO ES 細胞における ERK 経路の亢進	26
4-6. <i>Klf5</i> と GSK3 $\beta$ 阻害によるリプログラミングの促進	28

## 5. 考察

5-1. <i>Klf5</i> は Fgf-ERK 経路を介して Epi/PrE 分化を制御する上流因子である	30
5-2. <i>Klf5</i> は Fgf-ERK 経路を抑制することにより naïve 状態を保障している	33
5-3. <i>Klf5</i> は GSK3 阻害と協調して初期化を促進する	35

6. 結論	36
-------	----

7. 参考文献	37
---------	----

8. 謝辞	47
-------	----

9. 図表	48
-------	----

10. 参考論文	74
----------	----

## 要旨

マウス初期胚発生過程において、胚盤胞期胚の内部細胞塊(ICM)は胚組織全体に分化する多能性を持つエピブラスト(Epi)と胚体外組織に分化する原始内胚葉(PrE)へ分化する。初期の ICM の全ての細胞は *Nanog* と *Gata6* を確率論的に共発現し、次第に Epi 系列の細胞は *Nanog*、PrE 系列の細胞は *Gata6* の発現が優位になり、中期胚盤胞期胚の ICM では *Nanog* 陽性細胞と *Gata6* 陽性細胞が salt-and-pepper 状に分布している。*Fgf-ERK* 経路はこの *Nanog* と *Gata6* の salt-and-pepper 状発現の形成に寄与していることが知られているが、どの様に *Fgf4*、*Nanog*、*Gata6* の発現が制御されているかは殆ど明らかにされていない。今回、我々は転写因子 *Klf5* が *Nanog* と *Gata6* の salt-and-pepper 状の発現様式が形成される前段階の E3.0 において *Fgf4* の発現を制御していることを初めて明らかにした。

E3.0 後期桑実胚期において、*Klf5* KO 胚では *Fgf4* の発現が mRNA、タンパクレベルで共に上昇しており、*Klf5* 過剰発現(OE)胚では *Fgf4* の発現が抑制されていた。*Fgf4* の発現上昇により *Klf5* KO 胚では *Nanog* 陽性細胞が著しく減少し、ICM は *Gata6* 陽性細胞が優位な PrE 系列に分化が偏っていた。また、*Fgf-ERK* 経路を阻害剤を用いて遮断することにより表現型のレスキューを試みた結果、*Klf5* KO 胚における細胞数の減少や胚盤胞の形成が有意にレスキューされた。さらに、PrE 系列へ分化傾向にある *Klf5* KO 胚の ICM において *Nanog* 陽性細胞が出現し、野生型胚で *Fgf-ERK* 経路を遮断した場合と同様に *Gata6* の発現はほぼ完全に消失した。一方、*Klf5* OE 胚では、野生型胚を *Fgf-ERK* 経路の阻害剤存在下で培養を行った際と同様に、*Nanog* の発現上昇と、PrE 関連遺伝子の発現の抑制が見られた。また、マウス ES 細胞においても *Klf5* は *Fgf-ERK* 経路を制御していることを見出した。さらに、*Klf5* は MEK 阻害剤に置き換わり、GSK3 阻害と協調して EpiSC の naïve 状態への初期化を促進する事を見出した。

これらの結果から、*Klf5* は初期胚発生において *Fgf-ERK* 経路を抑制することにより PrE/Epi 分化のバランスを制御していることが明らかになった。同様に、マウス ES 細胞においても *Fgf-ERK* 経路を抑制することにより naïve 状態の多能性を保障していると考えられる。

## 1. 序論

### 1-1. マウス初期胚発生過程

哺乳動物の着床前初期胚発生では三つの細胞系列が生じる。最初の細胞分化は後期桑実胚期から初期胚盤胞期に分化する栄養外胚葉系列 (trophectoderm; TE)であり、着床後に胎盤系列の細胞へ分化する。胚盤胞期に TE で囲まれた内側の細胞集団は内部細胞塊 (inner cell mass; ICM)であり、後期胚盤胞期以降に胚盤葉上層 (epiblast; Epi)および原始内胚葉 (primitive endoderm; PrE)を生じる。Epi は殆ど全ての胚体組織へ分化し、PrE は臓側内胚葉および壁側内胚葉、卵黄囊へ分化する (Rossant and Tam, 2009)。初期胚発生過程における最初の細胞分化は転写因子と細胞極性により制御されている。桑実胚期以前の胚では、全ての細胞系列に分化しうる能力を保持しているが、胚の内側に位置する細胞 (inner cell)と外側に位置する細胞 (outer cell)に極性が分かれつつある。どちらの細胞においても TE 分化に重要な転写因子である *Cdx2* と、ICM で発現し多能性の維持に重要な *Oct3/4* が共発現している。しかし、発生過程で outer cell では細胞間接触のシグナルが inner cell に比べて弱いため、Hippo シグナルは活性化されていない。その結果、転写共役因子である Yap1 は Lats1/2 によるリン酸化を受けずに核へ移行し、Tead4 と結合することにより *Cdx2* の発現を誘導し、outer cell は TE への分化が促進される (Nishioka et al., 2009)。一方、inner cell 側では細胞間接触のシグナルにより Hippo シグナルの下流で Lats1/2 が活性化されることで Yap1 がリン酸化を受ける。その結果、Yap1 は核移行できずに細胞質に留まるため、Tead4 と結合出来ず *Cdx2* の発現を誘導できない。その結果、inner cell 側では *Oct3/4* の発現が優位になり、内部細胞塊への分化が進む (Nishioka et al., 2009)。

一方、ICM から Epi と PrE の分化には多能性幹細胞の維持に重要な転写因子である *Nanog* と初期の PrE 系列のマーカーである *Gata6* が重要な機能を果たしている。*Nanog* と *Gata6* の mRNA は 2 細胞期から発現しており、16 細胞期から 32 細胞期までは全ての細胞においてタンパク質レベルで共発現している (Dietrich and Hiragi, 2007; Plusa et al., 2008; Guo et al., 2010)。32 細胞期以降、胚盤胞期(E3.5)の ICM では *Nanog* と *Gata6* をそれぞれの細胞で排他的に発現する salt-and-pepper

の分布が形成され、E3.75-4.0 まで維持される (Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008; Ohnishi et al., 2014)。どの様に *Nanog* と *Gata6* の共発現状態から salt-and-pepper の発現分布が形成されるかについては未だ明らかにされていない点が多く残されているが、Fgf-ERK (fibroblast growth factor- extracellular signal-regulated kinase)経路が重要な機能を果たしていることが報告されている (Chazaud et al., 2006; Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010; Kang et al., 2013; Krawchuk et al., 2013; Ohnishi et al., 2014)。Fgf-ERK 経路の活性化は Epi と PrE の分化バランスを制御しており、外因性の *Fgf4* により ICM の全ての細胞は PrE 系列の細胞へ分化する (Yamanaka et al., 2010)。一方、Fgf-ERK 経路の阻害や、*Fgf4* KO 胚では ICM の全ての細胞は Epi 系列へ分化する (Nichols et al., 2009)。*Fgf4* KO 胚盤胞は E3.25 (<32 細胞)における *Nanog* と *Gata6* の発現は正常であることから、初期の確率論的な *Nanog* と *Gata6* の共発現状態は *Fgf4* による Fgf-ERK 経路の活性化に依存していないと考えられる (Kang et al., 2013; Ohnishi et al., 2014)。その後、胚盤胞期以降の *Fgf4* KO 胚では *Gata6* の発現が消失し、ICM の全ての細胞は *Nanog* 陽性の Epi になる。同様に、*Gata6* KO 胚では ICM の全ての細胞は *Nanog* 陽性の Epi 系列に分化するが、E3.25 (<32 細胞)における *Nanog* 発現は変化しないことから、初期の *Nanog* の発現は *Gata6* と独立していると考えられる (Schrode et al., 2014)。*Nanog* と *Gata6* の salt-and-pepper の発現分布が形成される以前の E3.25 (<32 細胞)では既に *Fgf4* と受容体である *Fgfr2* の発現勾配が形成されており、*Fgfr2* を発現する細胞側では Fgf-ERK 経路の活性化により *Gata6* の発現が誘導され、一方 *Nanog* の発現は抑制されるため、*Gata6* の発現が優位になることで E3.5-3.75 における salt-and-pepper の発現分布が形成されると考えられている (Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014)。しかし、これまでに E3.25 (<32 細胞)における初期の *Fgf4*, *Nanog* および *Gata6* の発現がどの様に制御され、salt-and-pepper の発現分布の形成が進むのかは明らかにされていない。

## 1-2. 多能性幹細胞における未分化性維持機構

マウス胚性幹 (embryonic stem; ES)細胞は胚盤胞期胚の ICM から樹立され、三胚葉に分化しうる多能性と無限に増殖する自己複製能を有している (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981)。ES 細胞は様々な臓器や組織に分化誘導可能であることから、再生医学、特に細胞移植治療のリソースとして精力的に研究が進められている (Murry and Keller, 2008)。しかし、ES 細胞を再生医学に用いるためには、どの様に ES 細胞の多能性が維持されているのかを分子レベルで理解することが重要である。エピブラスト幹細胞 (Epiblast Stem Cells; EpiSCs)は着床後の円筒期胚 (E5.5)のエピブラストから樹立され、自己複製能と三胚葉分化能を持つ多能性幹細胞である。EpiSCs は ES 細胞同様に多能性を持つ幹細胞であるが、多くの点で ES 細胞と異なっている (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007)。ES 細胞はドーム状のコロニーを形成して増殖するのに対し、EpiSCs は一層のシート状のコロニーを形成する。ES 細胞の多能性の維持は白血病阻害因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF)に依存しており、Fgf-ERK 経路の活性化は分化を誘導するが、EpiSCs は LIF 応答性を示さず、多能性の維持は bFgf および Activin に依存している。ES 細胞では *Nanog* や *Rex1*、*Stella*、*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* が高発現しているが、EpiSCs ではこれらの遺伝子発現が抑制されており、分化関連遺伝子である *Fgf5* や *T* (*Brachyury*)を高発現している。ES 細胞の特徴として、胚盤胞期胚に注入することにより生殖系列を含むキメラに寄与する能力があるが、EpiSCs は三胚葉分化能を持つにも関わらずキメラに寄与することは出来ない。この様に、同じ三胚葉分化能をもつ多能性幹細胞でも性質が大きく異なっている (Nichols and Smith, 2009)。ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞同様に胚盤胞期胚の ICM から樹立されているが、遺伝子発現状態やコロニーの形態等は EpiSCs に類似している。マウス ES 細胞と EpiSCs の異なる性質を持つ多能性幹細胞の比較から、それぞれ naïve および primed と分類されている (Nichols and Smith, 2009)。これまでに、マウス ES 細胞型の naïve な多能性幹細胞はげっ歯類以外では樹立されておらず、ヒトやサル、ブタで樹立されてきた ES 細胞はキメラ貢献能を持たない primed 型の多能性幹細胞だと考えられる。近年、培養条件の最適化や naïve 状態への移行を促進する



遺伝子を用いることにより、ヒトにおいてマウス型の naïve な多能性幹細胞の特徴を有するヒト多能性幹細胞の樹立が報告されている (Chan et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Takashima et al., 2014)。

これまでに、マウス ES 細胞の多能性の維持には LIF を含む外因性因子や、LIF の下流で発現が誘導される *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog*、*Klf* ファミリー転写因子等が重要な機能を果たしていることが知られている (Niwa, 2007; Niwa et al., 2009)。また、ERK の抑制は強力に多能性を促進する (Ying et al., 2008)。一方、Fgf4-Fgfr-ERK 経路の活性化はマウス ES 細胞の多能性状態を不安定化し、primed 状態への移行を促進する (Kunath et al., 2007; Hamilton et al., 2013)。さらに、ERK および、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (Glycogen synthase kinase-3 beta; GSK3β) に対するそれぞれの阻害剤 (2-inhibitor; 2i) により、ES 細胞は LIF に依存せずに多能性の基底状態 (Ground state) で維持することが可能である (Ying et al., 2008)。しかし、ERK 阻害によりどの様に ES 細胞の多能性状態が安定化されているかは殆ど明らかにされていない。

### 1-3. *Klf* ファミリー転写因子

*Klf5* は *Klf2*、*Klf4* と同じく Krüppel-like factor (*Klf*) ファミリー転写因子群に属する転写因子である。*Klf* ファミリー転写因子はショウジョウバエからヒトを含む哺乳動物まで保存されており、発生や細胞分化、細胞の初期化等の様々な生理機能に重要な機能を果たしていることが報告されている (Lomberk and Urrutia, 2005; Suske et al., 2005; Takahashi and Yamanaka, 2006)。*Klf5* はマウス初期胚発生において 8 細胞期以降の全ての細胞で発現が見られる (Ema et al., 2008)。*Klf5* KO 胚は、*Klf2* KO および *Klf4* KO 胚と異なり、TE および ICM の発生にそれぞれ異常が見られ、着床前後に胚致死に至ることが報告されている (Ema et al., 2008)。*Klf5* KO 胚の ICM からは ES 細胞が樹立できないことから、ICM の ES 細胞化の過程に *Klf5* は必須であると考えられる (Ema et al., 2008)。*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* に対するショートヘアピン RNA (shRNA) を用いたノックダウン解析から、*Klf* それぞれの単独ノックダウンはマウス ES 細胞の多能性の維持に影響しないが、*Klf2/Klf4/Klf5*

を同時にノックダウンした場合は多能性が破綻することが報告されている (Jiang et al., 2008)。これらから、マウス ES 細胞の多能性の維持には *Klf2*、*Klf4*、*Klf5* が重複した機能を持ち、補完し合う事により協調的に機能していると考えられる。一方、*Klf5* を完全に欠失した *Klf5* KO ES 細胞は増殖能が著しく低下していることから、*Klf5* はマウス ES 細胞の細胞増殖に重要な機能を持つことが示されている (Ema et al., 2008)。さらに、*Fgf5* や *T* の発現が誘導されており分化傾向にあることから、*Klf5* は ES 細胞の多能性の維持にも重要な機能を果たしていると考えられる (Ema et al., 2008)。*Klf5* は naïve なマウス ES 細胞で高発現しているが primed 状態のヒト ES 細胞での発現は低いため、*Klf5* は naïve な多能性幹細胞の指標の一つと考えられている (Chan et al., 2013; Theunissen et al., 2014)。

*Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* は多能性幹細胞の維持に加えて、体細胞を人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) へ初期化する際の初期化因子としても重要な機能を有している (Takahashi and Yamanaka, 2006)。これらの因子はマウス初期胚発生過程において ICM の多能性の獲得に重要な機能を果たしており、それぞれの欠損マウスは着床前に ICM の形成異常により胚致死である (Nichols et al., 1998; Avilion et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Chambers et al., 2003)。一方、山中 4 因子の一つである *Klf4* や *Klf2* は ICM の多能性の獲得に必須ではなく、それぞれの欠損マウスは初期胚発生は正常である。*Klf4* KO マウスは上皮バリアの形成異常により出生後に、*Klf2* KO マウスは心血管系の形成異常により E14 前後にそれぞれ致死に至ることが報告されている (Segre et al., 1999; Lee et al., 2006)。体細胞の初期化において、*Klf1*、*Klf2*、*Klf5* は *Klf4* に置き換わり iPS 細胞に初期化する能力を有している (Nakagawa et al., 2008)。この様に、*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* はマウス ES 細胞の多能性の維持や体細胞の初期化において類似した機能を持つにも関わらず、初期胚発生における多能性の獲得に必須なのは *Klf5* だけである。

## 2. 研究目的

*Klf5* は *Klf2* および *Klf4* と異なり、初期胚発生過程や ES 細胞の樹立過程、ES 細胞の多能性維持に重要な機能を果たしていることが示唆されるが、分子メカニズムは殆ど明らかにされていない。18 種類同定されている *Klf* ファミリー転写因子の中で唯一初期胚発生に重要な *Klf5* の機能を理解することは、*Klf* ファミリーによる多能性幹細胞を含む種々の幹細胞の維持や、体細胞の初期化における機能を理解する上で重要であると考えられる。そこで、本研究では *Klf5* の初期胚発生および多能性の維持における分子メカニズムを明らかにすることを目的として、以下の課題を設けた。

- ①初期胚発生過程における *Klf5* の標的遺伝子の同定
- ②マウス ES 細胞における *Klf5* の機能解析
- ③体細胞の初期化における *Klf5* の機能解析

### 3. 材料と方法

#### 3-1. *Klf5* KO マウスおよび *Klf5* 過剰発現マウスの作製

*Klf5* コンディショナルノックアウトアレルを作製するため、*Klf5* 2<sup>nd</sup>-3<sup>rd</sup> エクソンを central arm として、2<sup>nd</sup> エクソン上流 2kb の 1<sup>st</sup> イントロンに 5' arm 及び 3<sup>rd</sup> エクソン 2kb 下流の 3<sup>rd</sup> イントロンに 3' arm 設計し、loxP-PGK-neo-DT cassette vector にサブクローニングを行うことでターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクターは E14 ES 細胞にエレクトロポレーションにより導入した。ES 細胞を樹立後、サザンブロット解析により相同組換えを確認した。FRT 配列に隣接する PGK-neo cassette は CAG-FLPe マウス (Jackson lab.) と交配を行うことで除去した。*Klf5*  $\Delta^{2nd, 3rd}$  エクソンアレルを得るため、loxP 配列に隣接する第 2、第 3 エクソンは全身で Cre recombinase を発現する Ayu-1 Cre マウスと交配することで除去した。*Klf5* KO マウスは胚致死であるため、*Klf5*  $^{+/\Delta^{2nd, 3rd}}$  エクソンマウスとして維持した。

コンディショナル *Klf5* 過剰発現 (over-expressing; OE) マウスは以下の様に作製した。まず、Venus-pA の下流の N 末端側に FLAG-HA を付加したマウス *Klf5* cDNA を繋ぎ CAG ベクターへ挿入した (CAG-loxP-Venus-pA-loxP-FLAG-HA-*Klf5*)。エレクトロポレーションにより C57B6/J ES 細胞へ導入し、Cre により Venus-pA を除去後、FLAG-HA タグを付加した *Klf5* タンパク質の発現が、内在性 *Klf5* の発現と同程度の細胞株を選別した (クローン N6)。Venus 配列除去前の ES 細胞株を用いて生殖系列キメラを作製し、コンディショナル *Klf5* OE (CAG-stop-*Klf5* Tg) マウスを得た。

#### 3-2. 胚操作と胚培養

マウスを交配後、プラグを得た日の正午を E0.5 とした。桑実胚と胚盤胞は卵管または子宮から PBS 中で灌流により採取した。灌流によって得た胚は PBS で良く洗い、体外培養は KSOM 培地 (Millipore) 中で、37°C 5% CO<sub>2</sub> 湿度飽和条件下で行った。阻害剤処理は 4-well dish (Nunc) 中に行い、ミネラルオイルは用いなかった。用いた阻害剤と濃度はそれぞれ、線維芽細胞増殖因子受容体

(Fibroblast Growth Factor Receptor; FGFR)阻害剤 SU5402 (Wako)、2 $\mu$ M; Mek 阻害剤 PD0325901 (Wako)、1 $\mu$ M; グリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK3 $\beta$ ; Glycogen Synthase kinase 3  $\beta$ ) 阻害剤 CHIR99021 (Wako)、3 $\mu$ M; c-Jun N 末端キナーゼ 1 (JNK; c-Jun N-terminal kinase 1) 阻害剤 JNK inhibitor II 、5 $\mu$ M; p38 阻害剤 SB203580 、10 $\mu$ M; ホスホイノシトール 3 キナーゼ (PI3K; phosphatidylinositol-3 kinase)阻害剤 LY 294002、10 $\mu$ M である。外因性 Fgf4 (PeproTech)は 500ng/ml で使用し、heparin (Sigma) 1 $\mu$ g/ml と共に KSOM 培地に添加した。

### 3-3. マウス初期胚の遺伝子型判定

5 $\mu$ g/ml Proteinase K (ProK) を含む Lysis buffer (50mM KCl、10mM Tris HCl [pH 8.3]、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mg/ml gelatin、0.45% v/v Nonidet P40、 0.45% v/v Tween 20) で胚を 56°C 40 分間処理した後、96°C 10 分間 ProK の不活性化を行い、ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液を鋳型として PCR 反応を行い、遺伝子型を決定した。遺伝子型判定に用いた primer は以下の通りである。

#### *Klf5* KO 胚の遺伝子型判定

##### *Wild type allele*

Forward; 5'-CAAATCCCAGAGACCATGCGTAACA-3'

Reverse; 5'-TGAAGATATTGTTACCTCCTGTGGT-3'

##### *Deletion allele*

Forward; 5'-AGGCCTGATAAAATAACCTAGTCCA-3'

Reverse; 5'-TAAGCACCGGTGCCTAACATGGTGA-3'

#### *Klf5* OE 胚の遺伝子型判定

##### *Klf5* Tg allele

*Klf5* 2-4ex fwd2 5'-GTACACCATGCCAAGTCAGTTTCTTC-3'

*Klf5* 2-4ex rev2 5'-GTTGGCACACCATGCACTGGAAC-3'

Cre recombinase

Cre S 5'-GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCGT-3'

Cre AS 5'-GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG-3'.

### 3-4. 免疫染色

卵管もしくは子宮から採取した胚は 4% パラホルムアルデヒド (PFA)により 10 分間 4°Cで固定した。固定後、PBS で胚を洗い、0.25% Triton / PBS を用いて 30 分間 4°Cで透過処理を行った。10% Donkey serum/ 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA)/ 0.01% Tween 20/ PBS 中で 1 時間 4°Cによりブロッキング反応を行った。1 次抗体は Mouse anti-Oct3/4 antibody (Santa cruz)、Rabbit anti-Oct3/4 antibody (Abcam)、Mouse anti-Cdx2 antibody (BioGenex)、Rabbit anti-Nanog antibody (Cosmobio)、Goat anti-Gata6 (R&D Systems)、Goat anti-Gata4 antibody (Santa cruz)、Rabbit anti-Fgf4 antibody (R&D Systems)、Goat anti-Sox17 antibody (R&D Systems)、Goat anti-Nkx2.5 antibody (Santa cruz)、Rat anti-CD31 antibody (BD)を使用し、ブロッキング溶液中で、4°Cで一晩反応させた。2 次抗体は Cy3-conjugated Donkey anti-Mouse IgG (Jackson Immunological)、Alexa Fluor 488-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG (Invitrogen)、Alexa Fluor 488-conjugated Donkey anti-Goat IgG (Invitrogen)、Alexa Fluor 633-conjugated Donkey anti-Goat IgG (Invitrogen)、Cy5-conjugated Donkey anti-Rat IgG (Jackson Immunological)、Cy3-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG (Jackson Immunological) をブロッキング溶液で 500 倍希釈して、4°Cで 3 時間反応させた。次に、Hoechst 33342 (1 µg/ml、Invitrogen) に 4°Cで 15 分間核染色を行った後、4% PFA で 10 分間 4°Cにより再度固定した。胚の観察には共焦点顕微鏡 Leica TCS SP5 または SP8 (Leica) を使用した。

### 3-5. BrdU 染色

胚を採取後、10µM BrdU を含む KSOM 培地 (Millipore)中で 37°C、2 時間培養を行うことにより、胚に Bromodeoxyuridine (BrdU)を取り込ませた。培養後は、BD Pharmingen BrdU in situ detection kit (BD)のマニュアルに従い、胚の固定、洗浄、BrdU

の検出を行った。

### 3-6. TUNEL 染色

マウス初期胚のアポトーシス細胞の検出は、DeadEnd™ Fluorometric TdT-mediated dUTP nick and labeling (TUNEL) system (Promega)を用いて、マニュアルに従って行った。

### 3-7. 共焦点レーザー顕微鏡による解析

共焦点画像は Leica TCS-SP5 または SP8 を用いて取得した。胚はガラスボトムディッシュ (IWAKI)上に 30% グリセロール/ PBS の液滴を作り、その上に乗せた。蛍光は Hoechst33342 に対して 405 nm UV レーザー、Alexa Fluor488 に対して 488nm レーザー、Cy3 に対して 552nm レーザー、Cy5 または Alexa Fluor633 に対して 638nm レーザーを用いてそれぞれ励起した。画像は HC PL APO CS2 40x/1.30 レンズを使用して、2.0-2.5  $\mu$ m の断面で取得した。また、検出器は Hybrid Detector (HyD, Leica)を用いた。Raw 画像は Leica ソフトウェア、または Adobe Photoshop CS6 を用いて処理した。細胞数は ImageJ (NIH)を用いて核を数える事により計測した。タンパク発現量は Kang らの方法により解析した (Kang et al., 2013)。ImageJ (NIH)を用いて対象領域における平均蛍光強度を測定し、Hoechst チャンネルの平均蛍光強度で規準化することにより発現量を求めた。

### 3-8. 内部細胞塊からの ES 細胞の樹立

ES 細胞の樹立に用いる内部細胞塊 (ICM)は免疫手術法によって単離した。*Klf5*<sup>+/+</sup>マウス交雑受精由来の胚盤胞を子宮から灌流により採取し、M2 培地で良く洗った。20% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS )を含む M2 培地 (M2-FBS) で 1:8 希釈した Rabbit anti-mouse Red blood cell solution (Inter-cell technologies, inc.) で 37°C、10 分間反応させた。次に M2-FBS で 1:3 希釈した guinea pig serum (Calbiochem) で 37°C、15 分間反応させた。透明帯は Acidic Tyrode (Sigma) の液滴中で 2-3 分間反応させることで取り除いた。透明帯を取り除いた胚は M2-FBS

の液滴中でガラスキャピラリーを用いて数回ピペッティングを行うことで、Lysis した栄養外胚葉を取り除き、ICM を単離した。単離した ICM は予めマイトマイシン C (Sigma) 処理を施した MEF (Mouse Embryo Fibroblast) 上で、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (自家調整、1,000 U/ml) を添加した ES 細胞培地 (DMEM high glucose (GIBCO), 20% FBS, 1mM sodium pyruvate (GIBCO), 0.1mM non-essential amino acid (GIBCO), 50 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol) 中で培養を行った。4-5 日後、ICM 由来のコロニーが大きくなった後、顕微鏡下でコロニーをピックアップし、0.25% Trypsin EDTA (GIBCO) で単一細胞に乖離した。単一細胞に乖離した ES 細胞は新しい 24-well plate の MEF 上に播種した。2-3 日後、コロニーが十分大きくなったのを確認した後、一部をピックアップし遺伝子型判定に用いた。

### 3-9. 初期胚由来 RNA からの cDNA 増幅

初期胚からの RNA 抽出と cDNA 増幅は single-cell cDNA amplification method で行った (Kurimoto et al., 2007)。

### 3-10. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、single-cell cDNA amplification method (Kurimoto et al., 2007) により増幅したサンプルを元に、受託にて行った (WT; n=5, KO; n=5)。マイクロアレイデータは Genespring (TOMY Digital Biology) を用いて解析した。

### 3-11. リアルタイム RT-PCR

SYBR Premix Ex Taq II (Takara) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System, TP850 (Takara) にてリアルタイム RT-PCR を行った。全ての標的遺伝子の発現量は、 $\beta$ -actin (Actb) 遺伝子の発現量で標準化した。リアルタイム RT-PCR に用いた primer 配列は表 2 に示した。

### 3-12. マウス ES 細胞、EpiSC の培養とトランスフェクション

$Klf5^{+/+}$  (WT)::Oct3/4-ireszeocinR ES 細胞、及び  $Klf5^{lacZ/hyg}$  (KO)::Oct3/4-ireszeocinR



ES 細胞は先行研究において樹立された細胞株を用いて、DMEM +15% KSR (knockout Serum Replacement; Invitrogen)培地で培養した (Ema et al., 2008)。また、OCRG9 (Oct3/4-CFP::Rex1-GFP-irespuroR) ES 細胞 (Toyooka et al., 2008)に対して 3-1 と同様の方法で相同組換えを行い、新たに *Klf5* KO ES 細胞株を樹立した。

ES 細胞の増殖能は  $1 \times 10^3$  細胞を 24well plate へ播種し、阻害剤の存在下で 48 時間培養後に計測した。

マウスエピブラスト幹細胞 (EpiSC)、OZ7 株は Austin Smith 博士に分与頂いた (Guo et al., 2009)。EpiSC は 12ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor; R&D)と 20ng/ml Activin A (R&D)を添加した NDiff227(N2B27)培地 (Stem Cells Sciences Ltd.)を使用し、fibronectin coated dish 上で培養した。

マウス ES 細胞と EpiSC へのトランスフェクションは  $4 \times 10^4$  細胞に対して 1 $\mu$ g plasmid DNA を Lipofectamine2000 (Invitrogen)を使用して行った。遺伝子導入細胞の選別は 250 $\mu$ g/ml Hygromycin B (WAKO)存在下で 5 日間培養することで行った。

EpiSC の初期化は、 $3 \times 10^4$  細胞を fibronectin coated dish に播種して 24 時間培養後、2i (1 $\mu$ M PD0325901; WAKO, 3 $\mu$ M CHIR99021; WAKO)/LIF (自家調整、1,000 U/ml)または 3 $\mu$ M CHR99021 (CH)/LIF (1,000U/ml)を添加した N2B27 培地することにより誘導した。7 日目に *Oct3/4*  $\Delta$ PE-GFP 陽性コロニー数を計測した。また、アルカリフォスファターゼアッセイは Alkaline Phosphatase Leukocyte kit (Sigma)を用いてマニュアルに従って行った。

### 3-13. フローサイトメトリー解析

マウス ES 細胞または EpiSCs は 0.25% Trypsin/EDTA (Invitrogen)により単一細胞に乖離後、PE-conjugated rat anti-mouse CD31 (PECAM1; BD Bioscience)抗体と反応させた。FACSCalibur flow cytometry system (BD Bioscience)を用いてフローサイトメトリー解析を行った。また、データ処理には Flowjo (TOMY Digital Biology)を使用した。

### 3-14. ウェスタンブロッティング解析

ES 細胞または EpiSC の溶解とウェスタンブロッティングは以前の報告に従って行った (Ema et al., 2008)。各サンプルのタンパク質は PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写後、rat anti- mouse Klf5 antibody (KM1784; Kyowa KIRIN)、rabbit anti-phosphorylated ERK antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-ERK antibody (Cell Signaling Technology)、anti- $\beta$ -actin antibody (MBL) を用いて 4°C で一晩反応させた。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) が結合した HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen)、HRP-conjugated goat anti-rat IgG antibody (Invitrogen) を使用し、室温で 1 時間浸透させながら反応させた。シグナルは Chemi-Lumi One Super (nakarai tesque) を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare) で検出した。得られたシグナルは、ImageJ (NIH) を用いて定量した。

### 3-15. クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析

クロマチン免疫沈降解析は (Chromatin immunoprecipitation assay; ChIP assay) は以前の報告に従って行った (Ito et al., 2013)

### 3-16. ChIP-sequencing (ChIP-seq) データ解析

ChIP-seq FASTQ ファイルは EMBL-EBI からダウンロードした。Klf2 は Yeo らの報告 (Yeo et al., 2014; PMID:24905170; E-MTAB-2365)、Klf4 と Klf5 は Askoy らの報告 (Askoy et al., 2014; PMID:24770696; E-GEOD-49848) でそれぞれ行われたデータを用いた。ChIP-seq の読み取りデータは Burrows-Wheeler Aligner (BWA) software を使用して mouse reference genome (mm9) 上にマッピングした。

### 3-17. 統計解析

データは Mean $\pm$ SE (Standard Error) で示した。統計解析には GraphPad Prism6 (GraphPad Software) を使用した。

## 4. 結果

### 4-1. *Klf5* KO 胚では Fgf-ERK 経路が亢進している

先行研究において、*Klf5* は着床前の初期胚発生に重要な機能を果たしていることが示されているが、その分子メカニズムは不明のままであった (Ema et al., 2008; Lin et al., 2010)。そこで、新たに組織特異的、時期特異的にほぼすべての翻訳領域 (open reading frame; ORF) を欠失させること (*Klf5*  $\Delta 2^{\text{nd}} 3^{\text{rd}}$  exon) が可能な *Klf5* コンディショナルノックアウト (conditional knock out; cKO) マウスを作製した (図 1a)。当研究室の先行研究で作製した *Klf5* lacZ マウス (図 1b) と同様に、*Klf5*  $\Delta 2^{\text{nd}} 3^{\text{rd}}$  exon ヘテロ欠損マウス同士の交配からはホモ欠損マウスは生まれず、着床前に胚致死であった。E2.5 桑実胚期 *Klf5* KO 胚 (*Klf5* lacZ/lacZ, *Klf5*  $\Delta 2^{\text{nd}} 3^{\text{rd}}$  exon/ $\Delta 2^{\text{nd}} 3^{\text{rd}}$  exon) における Oct3/4、Cdx2 の発現を免疫染色により解析した結果、どちらの *Klf5* KO 胚も野生型 (wild type; WT) 胚と同等の発現レベルであった (図 1c)。これより、本研究では *Klf5*  $\Delta 2^{\text{nd}} 3^{\text{rd}}$  exon マウスを用いて解析を行った。

E3.0 *Klf5* KO 胚は WT と比較して *Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2*、*Cdx2* の mRNA 発現レベルに有意な差が無いことから、*Klf5* KO の表現型が現れる前段階であると考えられるため、初期の標的遺伝子の変動を捉えることが期待される (図 1d)。そこで、*Klf5* により制御される初期胚発生過程の分子メカニズムを明らかにするため、E3.0 WT および *Klf5* KO 胚由来の RNA から増幅した cDNA を用いてマイクロアレイ解析を行った (図 2a)。Gene ontology 解析の結果、*Klf5* KO 胚で発現が上昇している 335 遺伝子においてヘモグロビン結合関連やインターロイキン 11 (IL-11) シグナル関連遺伝子等が特に濃縮されていた (図 2b)。マイクロアレイ解析の結果から、*Klf5* KO 胚では Fgf-ERK 経路のリガンドである *Fgf4* の発現が上昇しており、一方、Fgf-ERK 経路の抑制に機能する *Spry4* の発現が低下していることを見出した (図 2c)。また、ERK の脱リン酸化酵素である *Dusp* (Dual specificity phosphatase) ファミリー遺伝子の発現は *Klf5* KO 胚で低下しており、PrE 系列のマーカーである *Pdgfra* および *Sox17* の発現は *Klf5* KO 胚で上昇していた (図 2c)。マイクロアレイ解析の結果と同様に、リアルタイム RT-PCR 解析でも E3.0 *Klf5* KO 胚における *Fgf4* と *Sox17* の有意な発現上昇を確認した (図 2d)。また、*Fgf4* タ

ンパクに対する抗体を用いて免疫染色を行った結果、*Klf5* KO 胚では *Fgf4* の発現がタンパクレベルでも発現が上昇していることを見出した (図 2e,f)。これらの結果から、*Klf5* KO 胚では *Fgf4* の発現上昇により *Fgf4*-*FgfR*-ERK 経路が亢進しており、その結果 PrE 系列に分化が進んでいることが示唆された。

*Klf5* がこれらの遺伝子を直接制御しているかどうかを既存の ChIP-seq 解析データを元に解析した結果、マウス ES 細胞において *Klf5* は *Fgf4*、*Spry4*、*Dusp1/6/7/9* の遺伝子座に結合領域を持つことが分かった (図 3a)。エピトープタグを付加した *Klf5* を発現する ES 細胞株を用いて ChIP アッセイ法によりこれらの遺伝子に対する *Klf5* の結合を解析した結果、*Klf5* は *Fgf4* および *Spry4* 遺伝子座に結合していることが明らかになった (図 3b)。以上の結果から、*Klf5* は *Fgf4* 遺伝子の発現制御領域に直接結合することによりその発現の抑制に機能していることが示唆された。

*Klf5* 単独で *Fgf4* の発現抑制に十分な機能を果たしているかどうかを明らかにするため、*Klf5* コンディショナル過剰発現 (CAG-stop-*Klf5*) マウスを作製した (図 4a)。CAG-stop-*Klf5* マウスでは全身で一様に Venus を発現しており、組織特異的、時間特異的に組換え酵素 Cre を発現させることにより内在性の *Klf5* 発現量と同程度の FLAG-HA タグを付加した *Klf5* を発現する (図 4b,c,d)。CAG-stop-*Klf5* マウスと受精卵から全身性に Cre を発現する、*Ayu-1* Cre マウスの交配により受精卵から *Klf5* を過剰発現させ、胚盤胞期において *Fgf4* の発現を解析した。その結果、WT と比較し *Klf5* OE 胚ではタンパクレベルで *Fgf4* の発現が減弱していた (図 4c,e)。以上の結果から、*Klf5* は初期胚発生過程において *Fgf4* の発現を直接制御することで抑制に機能していると考えられる (図 4f)。

#### 4-2. *Klf5* は Epi/PrE 系列の分化バランスを制御している

WT マウス胚を外因性 *Fgf4* の存在下で培養を行うことにより、ICM の全ての細胞は PrE 系列へ分化することが報告されている (Yamanaka et al., 2010)。そこで、*Klf5* KO 胚における *Fgf4* の発現上昇が Epi/PrE 系列の分化バランスに影響を及ぼしているかどうか解析した。E3.25 から着床直前の E4.5 まで 6 時間毎に WT および *Klf5* KO 胚を採取した結果、*Klf5* KO 胚は E3.25 以降の全ての発生段階で WT よりも細胞数が少なく、64 細胞を超える胚は存在しなかった (図 5a)。チミジンのアナログである BrdU を E3.5 胚に取り込ませた結果、*Klf5* KO 胚では BrdU 取り込みが減少しており、細胞周期の進展に異常を来していることが考えられた (図 5b,c)。TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出と BrdU の取り込み状態を E3.25 の同一胚において解析した。その結果、*Klf5* KO 胚で BrdU の取り込みが低下している細胞は TUNEL 陽性であることから、細胞周期の進展異常はアポトーシスを促進していることが推測された (図 5d)。

初期の Epi と PrE の分化マーカーである *Nanog* と *Gata6* の発現を免疫染色により解析した結果、E3.25 における確率論的な *Nanog* と *Gata6* の共発現状態に変化はなかった (図 6)。しかし、タンパク発現レベルを蛍光強度を元に定量した結果、E3.25 *Klf5* KO 胚では *Nanog* の発現は低下していた (図 7a)。一方、*Gata6* の発現は *Klf5* KO 胚において有意に上昇していた (図 7b)。E3.5-3.75 の胚盤胞期 *Klf5* KO 胚の ICM では顕著に *Nanog* 陽性細胞が消失し、殆どの細胞は *Gata6* 陽性細胞であった (図 6; 図 7c, d)。これまでのマウス初期胚発生における Epi/PrE 分化研究から、E3.75 までの Epi/PrE それぞれの前駆細胞は可塑性を維持しており、その後徐々に運命決定が進み E4.25-E4.5 までに完全に可塑性は失われることが報告されている (Nichols et al., 2010; Yamanaka et al., 2010)。そこで、E4.0 および E4.25 *Klf5* KO 後期胚盤胞を解析した結果、どの発生段階においても ICM の殆どの細胞は *Gata6* 陽性であり、*Nanog* 陽性細胞は僅かであった (図 6a; 図 7c,d)。これらの表現型は、外因性 *Fgf4* 存在下で培養した WT 胚の表現型に類似している (Yamanaka et al., 2010)。図 5a で示した様に *Klf5* KO 胚は E3.25 以降の細胞増殖がほぼ停止している。細胞周期の進展異常が遺伝子発現に影響を及ぼす影響を排

除するために、同細胞数の発生段階 (<32 細胞、32-64 細胞)で *Nanog*/*Gata6* 陽性細胞の割合および発現量を WT と比較した結果、発生段階毎に比較した場合と同様の結果を示した (図 7b',c')。

E3.25 *Klf5* OE 胚も WT 胚と同様に確率論的な *Nanog* と *Gata6* の発現パターンを示していた (図 6a)。しかし、*Klf5* OE 胚における *Nanog* のタンパク発現レベルは約 2 倍上昇しており、一方 *Gata6* の発現レベルは低下していた (図 7a, b)。*Klf5* OE 胚の個々の細胞を解析した結果、全ての発生段階で胚あたりの *Nanog* 陽性細胞の割合が増加していた (図 7c,c')。一方、*Gata6* 陽性細胞の割合は 32-64 細胞期までの初期-中期胚盤胞期では減少していたが、後期胚盤胞期に相当する 64-128 細胞期では *Gata6* タンパク発現レベルは低下しているものの WT との差はなくなっていた (図 7b, b', d, d')。この表現型は *Fgf4*<sup>+/+</sup> 胚における *Nanog* 陽性 Epi 系列細胞数の増加と *Gata6* 陽性 PrE 系列細胞数の減少に類似したものであると考えられる (Krawchuk et al., 2013)。*Fgf4*<sup>+/+</sup> 胚では PrE 系列の分化に遅延が見られるにも関わらず、正常に着床し、発生する (Krawchuk et al., 2013)。従って、*Klf5* OE 胚において *Fgf4* が完全に抑制されていないことに起因するものと考えられる (図 4e)。

E3.25 の WT では確率論的な *Nanog* と *Gata6* の共発現状態にある。E3.25 の個々の細胞における *Nanog* および *Gata6* の発現量をプロットした結果、*Klf5* KO 胚は既に *Nanog* low/*Gata6* high の PrE 系列に個々の細胞が移行しており、*Klf5* OE 胚は *Nanog* high/*Gata6* low の Epi 系列に個々の細胞が移行している状態であることを見出した (図 8a)。マウス ES 細胞において *Klf5* は *Nanog* を直接制御し、発現を促進していることが報告されており (Jiang et al., 2008)、初期胚発生においても *Klf5* は *Nanog* の発現を直接制御により促進していることが考えられる(図 8b)。マウス ES 細胞において *Gata6* 遺伝子座には *Klf5* の結合領域が存在していることから、初期胚発生において *Klf5* は *Gata6* の発現を直接抑制していることが推測される (図 8b)。以上の結果から、初期の確率論的な *Nanog* と *Gata6* の共発現状態の形成時に *Klf5* は *Nanog* の発現を誘導し、*Gata6* の発現の抑制に機能することで、その後の Epi と PrE 系列の分化バランスを制御していることが推測される(図 8c)。

PrE 系列への分化は *Gata6*、*Sox17*、*Gata4* および *Sox7* の発現が段階的に誘導されることにより制御されている。*Sox17* は 32-64 細胞期に *Gata6* 陽性細胞において Fgf-ERK 経路の活性化により発現が誘導される。*Gata4* は 64 細胞期以降の後期胚盤胞期において、*Nanog* と *Gata6* の salt-and-pepper の排他的な発現様式が形成された後に発現する。Lin らによる報告 (Lin et al., 2010)と同様に、E3.5 *Klf5* KO 胚では *Sox17* の発現が上昇しており、陽性細胞数も増加していた(図 9a, b, c)。さらに、E3.75 *Klf5* KO 胚では *Gata4* 陽性細胞数が有意に増加していた(図 9d, f)。*Gata4* の発現は *Klf5* KO 胚で上昇しており、*Klf5* OE 胚では抑制されていた (図 9e)。以上の結果から、*Klf5* は PrE 分化を抑制的に制御していることが示唆される。

E3.25からE4.25の*Klf5* OE胚における*Nanog*の発現上昇は、Epi系列に分化が傾倒している細胞がnaïve状態を保持したまま成熟したEpi細胞へ分化できていないことが示唆される。マウス初期胚発生では、E4.25からE4.5 後期胚盤胞期においてPrE系列に分化の傾倒した細胞は胞胚腔の表層へ局在化 (sorting)し、その結果一層の上皮組織であるPrEを形成する (Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008; Meilhac et al., 2009; Artus et al., 2010; Morris et al., 2010; Artus et al., 2011; Frankenberg et al., 2011)。そこで、E4.5 WTおよび*Klf5* OE胚における*Nanog*と*Gata6* 陽性細胞の分布を解析した結果、WTでは*Gata6*陽性細胞が胞胚腔表面に局在化し、一層のPrEを形成していたのに対し、*Klf5* OE胚では*Nanog*と*Gata6*のsalt-and-pepperの分布を維持しており、*Gata6*陽性細胞の胞胚腔側への局在化とPrEへの分化が起きていなかった (図10)。また、*Nanog*陽性細胞が凝集していないため、成熟Epiへの分化も進んでいないと考えられる。初期胚発生における*Klf5*の偏在的な発現の影響を明らかにするため、着床後のE5.5 円筒期胚を解析した。WT円筒期胚において*Klf5*は胚体外外胚葉 (extra-embryonic ectoderm)で強く発現しており、エピブラストでの発現は消失していた (図11a)。一方、*Klf5* OE胚ではエピブラストを含む全ての細胞系列で発現が認められ、*Gata4*陽性の壁側内胚葉 (parietal endoderm)およびOct3/4陽性のエピブラストの構造は正常であった (図11a)。また、中胚葉系列の発生が進んでいるE8.0 *Klf5* OE胚もWTと比較して正常であったが (図11b)、E9.5以降に何らかの発生異常により胚致死に至っていた。

初期胚発生過程における *Klf5* の loss-of-function および gain-of-function 解析の結果から、*Klf5* は Epi/PrE 分化のバランスを制御していることが明らかになった。



#### 4-3. *Klf5* KO 胚における Fgf-ERK 経路の阻害は Epi への分化をレスキューする

*Klf5* KO 胚では細胞増殖の異常と ICM 全体が PrE 系列への分化傾向にあることを見出したが、*Fgf4* の発現上昇とそれによる Fgf-ERK 経路の亢進との因果関係は明らかではない。そこで、*Klf5* KO 胚における *Fgf4* の発現上昇とそれによる Fgf-ERK 経路の亢進が細胞増殖能の低下と Epi/PrE の分化異常をもたらしているかどうかを明らかにするため、*Fgfr1/2* に対する阻害剤 (SU5402) および MEK に対する阻害剤 (PD0325901) をそれぞれ用いた (図 12a)。E2.75 桑実胚期胚を阻害剤存在下で 24 時間培養した結果、*Fgfr1/2* および MEK を阻害することにより *Klf5* KO 胚は拡張した胞胚腔を形成し、WT と同様に正常な胚盤胞へ発生した (図 12b)。細胞数も増加していたものの、WT より有意に少ないままであることから、*Klf5* は初期胚発生における細胞増殖の一部を Fgf-ERK 経路を介して制御していることが示唆される (図 12c)。TUNEL 陽性細胞数は *Klf5* KO 胚で MEK 阻害により顕著に減少しており、WT 胚と同程度であった (図 12c)。一方、外因性の *Fgf4* により *Klf5* KO 胚の表現型の再現を試みた結果、WT 胚において細胞数の減少と TUNEL 陽性細胞の増加が見られた (図 12d, e)。Fgfr の下流には MAPK 経路の他に PI3K/AKT 経路、p38 経路および JNK 経路がそれぞれ活性化されるが、MEK 阻害剤以外では *Klf5* KO 胚の表現型をレスキューすることは出来なかった (図 13a, b)。以上の結果から、*Klf5* KO 胚では *Fgf4* の発現上昇により、Fgf-ERK 経路が亢進することで細胞増殖能の低下および細胞死が引き起こされていることが示された。

次に、*Klf5* KO 胚における Fgf-ERK 経路の活性化が PrE への分化を促進しているかどうかを明らかにするため、E2.5 桑実胚期 WT および *Klf5* KO 胚を MEK 阻害剤の存在下で 24 時間から 48 時間培養し、*Nanog* および *Gata6* の発現を解析した (図 14a)。E2.5 から *in vitro* で 24 時間発生させた *Klf5* KO 胚盤胞は、*in vivo* で発生した *Klf5* KO 胚と同様に *Nanog* の発現が消失し、ICM のほぼ全ての細胞が *Gata6* 陽性細胞で占められていた (図 14b)。一方、MEK 阻害剤存在下で 24 時間培養した *Klf5* KO 胚の ICM の全ての細胞は *Nanog* 陽性の Epi 系列の細胞に置き換わっており、*Gata6* 陽性細胞は消失していた (図 14b)。MEK を阻害した *Klf5* KO

胚の *Nanog* のタンパク発現レベル及び *Nanog* 陽性細胞数は MEK 阻害剤存在下で培養した WT と同等であった (図 14c)。*Gata6* のタンパク発現レベル及び陽性細胞数も MEK 阻害剤存在下で培養した WT と同様に、MEK を阻害した *Klf5* KO 胚では発現および陽性細胞が消失していた (図 14b, c)。また、*Klf5* KO 胚を E2.5 から E4.5 まで 48 時間 MEK 阻害剤存在下で培養した結果、胚全体が *Nanog* 陽性の Epi 細胞になり、TE 細胞がほぼ消失していた (図 14b')。先行研究において、*Klf5* KO 胚の ICM からは ES 細胞が樹立出来ないことから、*Klf5* は ICM からの ES 細胞の樹立過程で重要な機能を果たしていることが報告されている (Ema et al., 2008)。そこで、MEK 阻害剤存在下で培養した *Klf5* KO 胚の ICM から ES 細胞の樹立を試みた。その結果、60 の ES 細胞株を樹立し、そのうち 7 株が *Klf5* KO だった。従って、MEK 阻害は *Klf5* KO 胚における Epi 細胞の発生をレスキューし得ることが示唆される (表 1a)。MEK 阻害剤により発生をレスキューした *Klf5* KO 胚を偽妊娠仮親雌マウスの子宮内に胚移植し、*in vivo* での発生能を評価した結果、E7.5 において *Klf5* KO 胚は存在しなかった。しかし、*Klf5* ヘテロ欠損マウス同士の交配時の同じ発生段階と比較して (Ema et al., 2008)、空の脱落膜が有意に多く存在したことから、移植した *Klf5* KO 胚は着床反応に至ったものの、その後の発生を維持出来なかったものと推測される (表 1b)。

MEK 阻害による *Nanog* のレスキューとは対照的に、*Klf5* KO 胚における MEK および *Fgfr* の阻害は *Cdx2* の発現に影響しなかった (図 15)。*Klf5* KO 胚における *Cdx2* の発現の低下は *Fgf*-ERK 経路の亢進に起因するものではないことから、*Klf5* は別のメカニズムにより *Cdx2* の発現を制御していることが示唆される。

#### 4-4. E3.0 における *Klf5* と *Fgf4* の発現の相関

E3.0-3.25 で見られる *Fgf4* と *Fgfr2* の排他的な発現は、Epi と PrE 系列の分化を誘導するシグナルであると考えられているが (Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014)、この発生段階において *Fgf4* の発現がどのように制御されているのかは殆ど明らかにされていない (Artus and Chazaud, 2014)。一方で、本研究の結果から *Klf5* は E3.0 において *Fgf4* に対する転写抑制因子として作用し、Epi/PrE 分化を制御していることを明らかにした。しかし、*Klf5* がどのように *Fgf4* の非対称性をもたらしているかは不明のままである。仮に、*Klf5* が *Fgf4* と *Fgfr2* の非対称性の発現を生み出す上流因子であれば、*Klf5* は *Fgf4* の発現と逆相関であることが予想される。そこで *Klf5* と *Fgf4* の発現を、E3.0 から E3.25 において単一細胞レベルで遺伝子発現を解析した 2 つのグループの報告の結果から解析した (Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014)。これまでの報告と同様に、*Fgf4* と *Fgfr2* の発現には単一細胞レベルで強い相関が認められたが、*Klf5* と *Fgf4* や *Spry4* を含む *Fgf4* の下流因子には相関は認められなかった (図 16a, b, c)。従って、*Klf5* は E3.0 において *Fgf4* の発現を抑制しているものの、*Fgf4* と *Fgfr2* の非対称性を生み出す上流因子であるとは断定できない。

#### 4-5. *Klf5* KO ES 細胞における ERK 経路の亢進

先行研究では、*Klf5* KO ES 細胞では細胞増殖能が低下しており、分化傾向にあることが示されている (Ema et al., 2008)。初期胚発生過程と同様に、ES 細胞の多能性維持においても *Klf5* が Fgf-ERK 経路の制御に機能しているかどうかを明らかにするため、*Klf5* KO ES 細胞におけるリン酸化 ERK (phosphorylated-ERK; pERK) をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、新たに樹立した 5 株の *Klf5* KO ES 細胞では WT および *Klf5*<sup>+/+</sup> ES 細胞よりも有意に pERK が存在しており、Fgf-ERK 経路が亢進していることが判明した (図 17a)。また、*Klf5* KO ES 細胞で MEK を阻害した結果、*Klf5* KO ES 細胞における細胞増殖能の低下が有意にレスキューされた (図 17b)。しかし、GSK3 $\beta$  の阻害では細胞増殖能はレスキューされなかった (図 17b)。 *Klf2* および *Klf4* により *Klf5* KO ES 細胞における ERK の活性化を抑制できるかどうか解析した結果、外因性の *Klf5* は WT ES 細胞と同じレベルまで ERK の活性化を抑制することが出来たのに対し、*Klf2* や *Klf4* では抑制することが出来なかった (図 17c)。このことから、*Klf5* は Fgf-ERK 経路の制御に関して *Klf2* および *Klf4* と独立した機能を持つことが示唆される。

マウス ES 細胞における *Nanog* や *Esrrb*、*Stella*、*Rex1* 等の多能性関連遺伝子の発現は不均一であり、さらに陽性と陰性の細胞集団の間を互いに周期的変動していることが知られている (Chambers et al., 2007; Singh et al., 2007; Toyooka et al., 2008; Hayashi et al., 2008; Martello et al., 2012; Festuccia et al., 2012)。これらの遺伝子の陽性集団はより未分化な naïve 状態にあり、陰性集団は primed な状態にあると考えられる。naïve 状態から primed 状態への以降には Fgf-ERK 経路の活性化が関与していることが報告されており、一方 MEK の阻害により primed から naïve 状態への移行を促進し、*Nanog*、*Esrrb*、*Stella*、*Rex1* の発現が均一な状態で維持可能である (Wray et al., 2010)。そこで、*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* OE ES 細胞を作製して *Nanog* の発現を免疫染色により解析した。WT ES 細胞で MEK を阻害した場合と同様に *Klf5* OE ES 細胞では均一な *Nanog* の発現を示していた (図 18a, b)。しかし、*Klf2*、*Klf4* OE ES 細胞では均一な *Nanog* 発現は観察されなかった。

マウス ES 細胞は LIF により多能性が維持されているのに対し、EpiSCs は LIF

応答性を示さず、bFGF に依存して多能性を維持している (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007)。また、マウス ES 細胞は bFGF を含む EpiSCs の培養条件で培養することにより、EpiSCs へ分化誘導することが可能である (Guo et al., 2009)。*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* および *Nanog* を *Rex1* の発現を GFP 蛍光により評価可能な ES 細胞に過剰発現させ、樹立した細胞株を用いて EpiSC への分化能を評価した (図 19a)。その結果、*Nanog* および *Klf5* を過剰発現させた ES 細胞は EpiSC への分化に抵抗性を示し、多くが未分化な *Rex1*-GFP 陽性の細胞集団に維持されていた (図 19b)。しかし、*Klf2* や *Klf4* ではほとんどが *Rex1*-GFP 陰性の画分へ移行していた (図 19b)。

以上の結果から、*Klf5* は ES 細胞において MEK 阻害剤と類似した機能を有しており、Fgf-ERK 経路の抑制に機能することで naïve 状態の多能性を保障していると考えられる。

#### 4-6. *Klf5* と GSK3 $\beta$ 阻害によるリプログラミングの促進

体細胞は *Klf4* を含む山中 4 因子により多能性を持つ iPS 細胞へ初期化することが可能である。*Klf* ファミリーの中では *Klf2* と *Klf4* が高い初期化能力を持ち、*Klf5* は効率が低いながら初期化能力を持つことが示されている(Nakagawa et al., 2010)。同様に、primed 状態の EpiSC は、*Nanog* や *Klf2*、*Klf4* の過剰発現により ES 細胞の培養条件下で naïve な ES 細胞の状態 (Epi-iPSCs)へ初期化し得ることが報告されている (Guo et al., 2010; Silva et al., 2010)。しかし、*Klf5* の EpiSC の初期化効率は無い、または *Klf2*、*Klf4* と比較して非常に低いとされている(Hall et al., 2009; Gillich et al., 2012)。そこで、外因性遺伝子の発現量を定量することが可能な FLAG-HA タグを付加した *Klf* の発現ベクターを、ES 細胞および naïve 状態で GFP 蛍光を発する Oct3/4  $\Delta$  PE-GFP transgene を持つ EpiSC (OZ7)へ過剰発現させ、それぞれの *Klf* の初期化能力を再検定した (図 20a)。空ベクターおよび、*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* を発現する EpiSC を樹立し、それぞれの *Klf* の発現量が同等であることを確認した (図 20b)。これらの EpiSCs を用いて、2i (MEK 阻害剤;PD0325901 と GSK3 阻害剤;CHIR99021)および LIF を含む培養条件(2i/LIF)で初期化を誘導し、GFP 蛍光およびアルカリフォスファターゼアッセイにより初期化能を評価した (図 20a)。これまでの報告と同様に、*Klf2* および *Klf4* は高い初期化能を有していたが、*Klf5* は中程度の初期化効率だった (図 20c,d)。*Klf5* により初期化された Epi-iPS 細胞の遺伝子発現を解析した結果、ES 細胞に類似した遺伝子発現を示していた (図 20e)。

初期胚発生過程およびマウス ES 細胞において *Klf5* は MEK 阻害剤に類似した機能をすることにより Fgf-ERK 経路を抑制していることを示した。同様に、*Klf5* が MEK 阻害剤に置き換わることで初期化を促進できるのではないかと推定した (図 21a)。そこで、*Klf5* OE EpiSCs を GSK3 阻害剤 (CHIR99021)と LIF を含む培養条件 (CH/LIF)で初期化を誘導した結果、2i/LIF 条件で初期化を誘導した場合よりも顕著に効率が高まっていた (図 21b, c)。一方、*Klf2* は CH/LIF 条件では殆ど初期化活性を示さず、*Klf4* は 2i/LIF より効率は落ちるものの、初期化された Epi-iPS が得られた (図 21b, c)。2i/LIF 条件下で初期化して得られた Epi-iPS 同様に、

CH/LIF 条件下で初期化して得られた Epi-iPS も ES 細胞に類似した遺伝子発現を示していた (図 21d)。また、naïve 状態のマウス ES 細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーである *Pecam1* (CD31) の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果、元の EpiSCs は *Pecam1* 陰性であるのに対し、CH/LIF 条件で初期化して得られた Epi-iPS はマウス ES 細胞と同様に *Pecam1* 陽性であった (図 21e)。naïve 状態の多能性幹細胞の特徴であるキメラ貢献能を評価するために、*Klf5* と CH/LIF 条件で初期化した Epi-iPS をマウス胚盤胞に注入したところ、胚および新生マウスにおいてキメラに寄与していた (図 21f)。以上の結果から、*Klf5* は EpiSCs の初期化において MEK 阻害剤に類似した機能を持ち、CH/LIF 条件で初期化を促進することを見出した。

## 5. 考察

### 5-1. *Klf5* は Fgf-ERK 経路を介して Epi/PrE 分化を制御する上流因子である

マウス初期胚発生の E3.25 (<32 細胞)の ICM の細胞は、Epi および PrE 系列の両方の分化能を維持しており、*Nanog* と *Gata6* を確率論的に共発現している (Plusa et al., 2006)。*Fgf4* および *Gata6* の loss-of-function の研究から、どちらの遺伝子も初期の確率論的な発現状態には影響しないことが示されている (Ohnishi et al., 2014; Kang et al., 2013; Schrode et al., 2014)。これまでの研究では、この確率論的な発現を制御する機構は殆ど明らかにされていない。本研究における、*Klf5* の loss-of-function 及び gain-of-function の解析から、E3.25 (<32 細胞)における初期の *Nanog* と *Gata6* の発現は *Klf5* により制御されていることを示した。マウス ES 細胞において *Nanog* と *Gata6* の遺伝子座には *Klf5* の結合領域を持つことから、直接発現が制御されていると考えられる。*Gata6*<sup>+/+</sup>胚は PrE 系列への分化遅延が観察され、PrE 細胞数も少ないが (Schrode et al., 2014)、*Klf5* KO および OE 胚における *Gata6* 発現の変動はむしろ中程度である (*Klf5* KO 20.4 ± 2.6% up, *Klf5* OE 8.4 ± 3.7% down)。この *Klf5* KO 胚における *Gata6* 発現の上昇と *Klf5* OE 胚における低下は ICM の Epi/PrE 分化バランスを変化させていると考えられるが、*Klf5* による *Nanog* と *Gata6* の制御における役割は明白で無いため、さらに解析が必要である。

初期の *Nanog* と *Gata6* の共発現状態から排他的な salt-and-pepper 様発現分布が形成されて Epi と PrE に分離するのに先立ち、*Fgf4* と *Fgfr2* の排他的な発現が形成されている (Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014)。しかし、どの様に対称性が失われ、排他的な発現が形成されるかは明らかにされていない。本研究において、*Fgf4* と *Fgfr2* の排他的な発現が形成される初期の発生段階において *Klf5* は *Fgf4* に対する転写抑制因子であることを明らかにした。さらに、*Klf5* KO 胚における PrE 分化の歪は *Fgfr* および MEK の阻害により逆転させることが可能であることから、*Klf5* は早発性の Fgf4-Fgfr-ERK 経路の活性化を抑制することで Epi と PrE 系列の細胞運命の決定を制御していることを示している。E3.0 と E3.5 における *Klf5* と *Fgf4* の発現に強い関連性が認められないため、*Klf5* が *Fgf4* と *Fgfr2* の排他的な発現形成を制御する直接的な証拠を示すことは出来なかったが、以下の



理由から *Klf5* が Epi と PrE の細胞運命を決定する因子の候補として挙げられると考えられる。まず、*Klf5* の *Fgf4* に対する転写活性において細胞間の可変性が存在することが考えられる。*Klf* はリン酸化、ユビキチン化、SUMO 化、アセチル化等の修飾を受けることが知られている。また、*Klf5* はコンテキスト依存性の転写因子であることが知られている。*Klf5* がリガンドと結合していない PPAR  $\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptor-delta) と相互作用した場合、*Klf5* は SUMO 化されて補助抑制因子と結合して標的遺伝子を抑制する(Oishi et al., 2008)。一方、PPAR $\delta$  がリガンドと結合している場合、*Klf5* は SUMO 化を受けずに活性化補助因子や CBP、p300 と結合して標的遺伝子の発現を活性化させる(Oishi et al., 2008)。さらに、がん細胞において *Klf5* は Tead/Yap1 等の Hippo 経路の因子と結合することが報告されており(Zhi et al., 2012; Wang et al., 2015)、PrE 分化における細胞極性や移動との関連が示唆される(Morris et al., 2010; Morris et al., 2013)。従って、*Klf5* はコンテキスト依存性の転写活性を示し、他の補助因子と相互作用することで排他的発現の形成に機能していることが推測される。第二に、図 2 で示す様に *Klf5* は *Spry4* や *Dusp* 等の Fgf-ERK 経路の下流で機能する ERK の抑制因子を制御していることが挙げられる。*Fgf4* だけでなく ERK 経路のネガティブ・フィードバックに機能する遺伝子を制御することにより *Fgf4* と *Fgfr2* の極性をもたらしていると推測される。

本研究では E3.0 において *Klf5* が *Fgf4* の発現を抑制していることを示したが、*Klf5* がその後の発生でも *Fgf4* の発現を抑制しているかどうかは明らかではない。*Klf5* KO ES 細胞では *Fgf4* の発現上昇は見られなかった。*Fgf4* と *Klf5* は ES 細胞において共に高発現しており、それぞれ分化と多能性の維持に重要である (Ema et al., 2008)。マウス ES 細胞の *Fgf4* のプロモーター及びエンハンサー領域には図 2g に示すように *Klf5* の結合領域が存在するにも関わらず、*Klf5* KO ES 細胞における *Fgf4* 発現は僅かに低下しているだけである。このことから、E3.0 から E3.25 における *Klf5* による *Fgf4* 発現の抑制とは対照的に、マウス ES 細胞での *Fgf4* の発現制御機能は殆ど機能していないことが示唆される。Nichols らの報告では、マウス ES 細胞は E4.25 のエピブラストに相当する遺伝子発現状態にあることが示

されている (Boroviak et al., 2014)。従って、*Klf5* による *Fgf4* の抑制は E3.25 までの発生段階で機能することで Epi と PrE の運命決定を制御しているが、マウス ES 細胞に相当する発生後期の成熟したエピブラストでは *Klf5* による *Fgf4* の抑制機能は失われていることが推測される。この仮説は、*Klf5* KO ES 細胞を WT 4 倍体胚と凝集させた場合 E8.5 まで正常に発生した結果と一致しており、*Klf5* は成熟したエピブラストが形成されて以降の発生には必要ではないことを示している (Ema et al., 2008)。

Lin らの報告では、WT と *Klf5* KO 胚において pERK の活性化状態に差はないことが示されていた (Lin et al., 2010)。一方、本研究では *Klf5* が Fgf-ERK 経路を抑制することを示しており、矛盾が生じている。pERK シグナルは E5.5 以降の胚で再現性良く可視化可能であることが報告されている (Corson et al., 2003)。一方、着床前の胚ではバックグラウンドシグナルが強くなり、pERK シグナルを適切に検出することが困難である (Frankenberg et al., 2011)。マウス初期胚発生において ERK の阻害は Nanog 陽性の多能性細胞の発生を促進する (Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010)。in vivo において ERK の阻害を介して多能性を促進するメカニズムが存在するかどうかは明らかにされていない。本研究の結果より、マウス初期胚発生過程で *Klf5* が Fgf-ERK 経路の抑制に機能していることが示されたことから、*Klf5* は in vivo において ERK の活性化の抑制を介して多能性を促進する重要な内在性因子であると考えられる。一方、マウス ES 細胞の多能性の維持において *Klf5* と協調的に機能している *Klf2* KO マウスは心血管系形成異常により胚致死であり (Lee et al., 2006)、*Klf4* KO マウスは上皮系の形成異常により出生後に致死である (Segre et al., 1999)。従って、*Klf2* と *Klf4* のどちらも初期胚発生における多能性細胞の発生には寄与していないため、in vivo における ERK の活性化の抑制は *Klf5* に特有の機能であると考えられる。しかし、マウス ES 細胞において *Klf2*、*Klf4*、*Klf5* は重複した機能を持つことにより互いに補完し合っているため、*Klf2* KO および *Klf4* KO マウスではそれぞれの機能が補完されている可能性が考えられる。従って、*Klf* の ICM の発達と多能性の獲得における機能を総合的に理解するためには、*Klf* のダブルノックアウトや、トリプルノックアウトマウ

スを用いた解析が今後必要である。

本研究において明らかにしたマウス初期胚発生における *Klf5* の機能を図 22 に示した。*Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することにより、Epi/PrE 分化を制御し、Nanog 陽性の多能性細胞の発生を保障していると考えられる。

## 5-2. *Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することにより naïve 状態を保障している

マウス ES 細胞における Fgf4-Fgfr-ERK 経路の活性化は多能性状態を不安定化し、primed 状態への移行を促進する (Burdon et al., 1999; Kunath et al., 2007; Hamilton et al., 2010)。一方、ERK 経路の阻害はマウス ES 細胞を未分化性の基底状態 (ground state) で安定的に維持することを可能にする (Ying et al., 2008)。しかし、ERK 経路の阻害によりどのような分子メカニズムで多能性状態が安定化されるのかは明らかにされていない。最近の研究では、*Klf2* や *Klf4* は Fgf-ERK 経路が活性化されると ERK によるリン酸化を受けることでプロテアソーム系により分解されることが示されている (Yeo et al., 2009; Kim et al., 2012)。マウス ES 細胞では *Klf2*、*Klf4* および *Klf5* が重複した機能を持ち補完しあうことで多能性維持に機能していることが示されている (Jiang et al., 2008)。本研究では、*Klf5* は Fgf-ERK 経路の抑制に機能しており、*Klf5* KO ES 細胞では顕著に pERK シグナルが増強していることを示した。しかし、*Klf2* や *Klf4* では *Klf5* KO ES 細胞における pERK シグナルの増強を抑制することは出来なかったため、Fgf-ERK 経路の制御は *Klf5* に特有の機能であることが考えられる。また、*Klf5* KO ES 細胞に *Klf4* を過剰発現させた場合さらに増殖能の低下を示した (Ema et al., 2008)。このことから、*Klf4* と *Klf5* はマウス ES 細胞の細胞増殖において相反する機能を持つことが考えられる。

その他の外因性及び内因性の因子も ERK 経路の抑制に機能していることが報告されている。外因性因子である BMP4 は ERK 特異的脱リン酸化酵素である *Dusp9* の発現を誘導することにより多能性状態の安定化に寄与している (Qi et al., 2004; Li et al., 2012)。また、MYC/MAX 複合体の *MAX* KO ES 細胞は ERK の活性化により未分化性が破綻し、分化が引き起こされることから、MYC/MAX 複合

体は *Dusp2* と *Dusp7* を制御することにより ERK の活性化を抑制していることが報告されている (Hishida et al., 2011; Chappell et al., 2013)。*Klf5* は *Spry4*、*Dusp2/6/7* の遺伝子座に結合領域を持つことを示した。*Klf5* KO ES 細胞では *Fgf4* の発現上昇は見られないにもかかわらず ERK 経路が活性化していることから、初期胚発生とは異なる機構により ERK 経路を制御していることが推測される。また、*Prdm14* はマウス ES 細胞において *Fgfr2* を制御することにより Fgf-ERK 経路の活性化を抑制し、naïve 状態を保証している (Yamaji et al., 2013)。また、*Prdm14* KO マウスは生殖細胞系列の形成不全により胚致死であるが、*Prdm14* KO 胚から ES 細胞が樹立出来ないことから、ICM から ES 細胞が樹立される過程で重要な機能を果たしていることが示唆されている (Yamaji et al., 2008; Yamaji et al., 2013)。この様に、*Prdm14* と *Klf5* の表現型には類似点が見られるが、今後 *Klf5* が *Prdm14* との相互作用や *Klf2* 及び *Klf4* と協調して Fgf-ERK 経路を制御しているのかどうかや、*Spry4* や *Dusp* を介して ERK 経路を抑制しているかどうかを解析することにより、*Klf5* による多能性維持の分子メカニズムが明らかになることが期待される。

### 5-3. *Klf5* は GSK3 阻害と協調して初期化を促進する

体細胞を iPS 細胞へ初期化する際に、*Klf* ファミリーの中でも *Klf1*、*Klf2*、*Klf5* は *Klf4* に代替することが可能である (Nakagawa et al., 2008)。同様に、*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* は primed 状態の EpiSC をマウス ES 細胞様の naïve 状態へ初期化することが可能である (Guo et al., 2009; Hall et al., 2010)。さらに、*Klf2* は *Prdm14* と相乗的に機能することにより、EpiSC の naïve 状態への初期化を劇的に促進する (Gillich et al., 2012)。*Prdm14* 単独では EpiSC を初期化する能力は殆どなく、また、*Klf4* や *Klf5* との組合せでは *Prdm14* は初期化を促進することは出来ない。従って、*Prdm14* は *Klf2* を特異的に標的遺伝子へリクルートすることにより初期化を促進していることが考えられる。本研究では *Klf5* は 2i/LIF よりも CH/LIF 条件下で効率的に primed 状態の EpiSC を naïve 状態 (Epi-iPS)へ初期化できることを示した。従って、*Klf5* は細胞の初期化において MEK 阻害に加えて他の機能も持つことが推測される。しかし、どのようなメカニズムにより初期化が促進されたのかは、明らかではない。GSK3 の阻害は Wnt 経路における  $\beta$ -Catenin を安定化し、共役タンパク質である Tcf3 を抑制することにより、その下流の *Esrrb* の発現を介して多能性状態を安定化させていることが報告されている (Martello et al., 2012)。今後、EpiSC の初期化において  $\beta$ -Catenin を始めとした Wnt 経路の因子と *Klf5* が相互作用することで CH/LIF 条件での初期化を促進しているのかどうかを検討することにより、初期化条件の最適化に繋がることが期待される。

## 6. 結論

マウス初期胚発生における *Klf5* の loss-of-function 及び gain-of-function の解析から、*Klf5* は E3.0-3.25 (<32 細胞)における *Fgf4*、*Nanog*、*Gata6* の発現を制御することにより、Epi/PrE の運命決定を制御していることが明らかになった (図 22)。また、*Klf5* KO 胚における PrE 系列への分化の歪は、MEK 阻害により分化転換可能であった。

マウス ES 細胞においても *Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することにより naïve な多能性状態を保障していることが明らかになった。しかし、*Klf2*、*Klf4* では *Klf5* KO ES 細胞における pERK の活性化を抑制出来ないことから、ES 細胞における Fgf-ERK 経路の抑制は *Klf5* に特異的な機能であることが示唆される。

*Klf5* は EpiSC を 2i/LIF 条件で naïve 状態へ初期化可能であるが、今回、MEK 阻害剤を含まない、GSK3 阻害剤と LIF (CH/LIF)により初期化が劇的に促進されることを見出した。

本研究により見出した多能性幹細胞の発生と維持、細胞の初期化における *Klf5* の機能を図 23 に示した。*Klf5* は多能性の獲得および維持において内在性の MEK 阻害剤に類似した遺伝プログラムとして機能し、Fgf-ERK 経路を抑制することにより保障していると考えられる。

## 7. 参考文献

- Artus, J., and Chazaud, C. (2014). A close look at the mammalian blastocyst: epiblast and primitive endoderm formation. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 3327–3338.
- Artus, J., Panthier, J.-J., and Hadjantonakis, A.-K. (2010). A role for PDGF signaling in expansion of the extra-embryonic endoderm lineage of the mouse blastocyst. *Development* *137*, 3361–3372.
- Artus, J., Piliszek, A., and Hadjantonakis, A.K. (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* *350*, 393–404.
- Avilion, A. a, Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.
- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., and Nichols, J. (2014). The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* *16*, 516–528.
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. a, et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* *448*, 191–195.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, a (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* *210*, 30–43.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 1–13.

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230–1234.

Chan, Y.-S., Göke, J., Ng, J.-H., Lu, X., Gonzales, K.A.U., Tan, C.-P., Tng, W.-Q., Hong, Z.-Z., Lim, Y.-S., and Ng, H.-H. (2013). Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* 13, 663–675.

Chappell, J., Sun, Y., Singh, A., and Dalton, S. (2013). MYC/MAX control ERK signaling and pluripotency by regulation of dual-specificity phosphatases 2 and 7. *Genes Dev.* 27, 725–733.

Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway . *Dev. Cell* 1–10.

Corson, L.B., Yamanaka, Y., Lai, K.-M.V., and Rossant, J. (2003). Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130, 4527–4537.

Dietrich, J.-E., and Hiiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 134, 4219–4231.

Ema, M., Mori, D., Niwa, H., Hasegawa, Y., Yamanaka, Y., Hitoshi, S., Mimura, J., Kawabe, Y., Hosoya, T., Morita, M., et al. (2008). Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell* 3, 555–567.



Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S.R., and Chambers, I. (2012). Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 11, 477–490.

Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Chazaud, C. (2011). Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev. Cell* 21, 1005–1013.

Gillich, A., Bao, S., Grabole, N., Hayashi, K., Trotter, M.W.B., Pasque, V., Magnúsdóttir, E., and Surani, M.A. (2012). Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors. *Cell Stem Cell* 10, 425–439.

Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136, 1063–1069.

Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., and Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell* 18, 675–685.

Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597–609.

- Hamilton, W.B., Kaji, K., and Kunath, T. (2013). ERK2 Suppresses Self-Renewal Capacity of Embryonic Stem Cells, but Is Not Required for Multi-Lineage Commitment. *PLoS One* 8, e60907.
- Hayashi, K., Lopes, S.M.C.D.S., Tang, F., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 3, 391–401.
- Hishida, T., Nozaki, Y., Nakachi, Y., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Ema, M., Takahashi, S., Nishimoto, M., and Okuda, A. (2011). Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell* 9, 37–49.
- Ito, I., Waku, T., Aoki, M., Abe, R., Nagai, Y., Watanabe, T., Nakajima, Y., Ohkido, I., Yokoyama, K., Miyachi, H., et al. (2013). A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J. Clin. Invest.* 123, 4579–4594.
- Jiang, J., Chan, Y.-S., Loh, Y.-H., Cai, J., Tong, G.-Q., Lim, C.-A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H.-H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 353–360.
- Johnson, M.H., and Ziomek, C. a (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24, 71–80.
- Kang, M., Piliszek, A., Artus, J., and Hadjantonakis, A.-K. (2013). FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140, 267–279.
- Kim, M.O., Kim, S.-H., Cho, Y.-Y., Nadas, J., Jeong, C.-H., Yao, K., Kim, D.J., Yu, D.-H., Keum, Y.-S., Lee, K.-Y., et al. (2012). ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 1–9.

- Krawchuk, D., Honma-Yamanaka, N., Anani, S., and Yamanaka, Y. (2013). FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* *384*, 65–71.
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* *134*, 2895–2902.
- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2007). Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nat. Protoc.* *2*, 739–752.
- Lee, J.S., Yu, Q., Shin, J.T., Sebzda, E., Bertozzi, C., Chen, M., Mericko, P., Stadtfeld, M., Zhou, D., Cheng, L., et al. (2006). Klf2 is an essential regulator of vascular hemodynamic forces in vivo. *Dev. Cell* *11*, 845–857.
- Li, Z., Fei, T., Zhang, J., Zhu, G., Wang, L., Lu, D., Chi, X., Teng, Y., Hou, N., Yang, X., et al. (2012). BMP4 Signaling Acts via dual-specificity phosphatase 9 to control ERK activity in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *10*, 171–182.
- Lin, S.-C.J., Wani, M. a, Whitsett, J. a, and Wells, J.M. (2010). Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo. *Development* *3963*, 3953–3963.
- Lomberk, G., and Urrutia, R. (2005). The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem. J.* *392*, 1–11.
- Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Göttgens, B., Niwa, H., and Smith, A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* *11*, 491–504.

- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638.
- Meilhac, S.M., Adams, R.J., Morris, S.A., Danckaert, A., Le Garrec, J.-F., and Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 331, 210–221.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.
- Morris, S. a, Teo, R.T.Y., Li, H., Robson, P., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2010). Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6364–6369.
- Morris, S. a, Graham, S.J.L., Jedrusik, A., and Zernicka-Goetz, M. (2013). The differential response to Fgf signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. *Open Biol.* 3, 130104.
- Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661–680.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.
- Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Stem Cell* 4, 487–492.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Ler, H.S., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1–13.

Nichols, J., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* 136, 3215–3222.

Nishioka, N., Inoue, K.I., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., et al. (2009). The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophoderm from Inner Cell Mass. *Dev. Cell* 16, 398–410.

Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635–646.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). LETTERS A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460, 118–122.

Ohnishi, Y., Huber, W., Tsumura, A., Kang, M., Xenopoulos, P., Kurimoto, K., Oleś, A.K., Araújo-Bravo, M.J., Saitou, M., Hadjantonakis, A.-K., et al. (2014). Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat. Cell Biol.* 16, 27–37.

Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Ohsugi, M., Kubota, T., Fujiu, K., Maemura, K., Kubota, N., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2008). SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR- $\delta$ . *Nat. Med.* 14, 656–666.

- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., and Hadjantonakis, A.-K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* *135*, 3081–3091.
- Qi, X., Li, T.-G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., Miura, S., Mishina, Y., and Zhao, G.-Q. (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6027–6032.
- Rossant, J., and Tam, P.P.L. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* *136*, 701–713.
- Schrode, N., Saiz, N., Di Talia, S., and Hadjantonakis, A.K. (2014). GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev. Cell* *29*, 454–467.
- Segre, J.A., Bauer, C., and Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat. Genet.* *22*, 356–360.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* *138*, 722–737.
- Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* *25*, 2534–2542.
- Suske, G., Bruford, E., and Philipsen, S. (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* *85*, 551–556.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., et al. (2014). Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell*.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F. a, Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199.

Theunissen, T.W., Powell, B.E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D.A., Reddy, J., Fan, Z.P., Maetzel, D., Ganz, K., Shi, L., et al. (2014). Systematic Identification of Defined Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell* 15, 471–487.

Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K., and Niwa, H. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* 135, 909–918.

Wang, C., Nie, Z., Zhou, Z., Zhang, H., Liu, R., Wu, J., Qin, J., Ma, Y., Chen, L., Li, S., et al. (2015). The interplay between TEAD4 and KLF5 promotes breast cancer partially through inhibiting the transcription of p27Kip1. *Oncotarget*.

Wray, J., Kalkan, T., and Smith, A.G. (2010). The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1027–1032.

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40, 1016–1022.

Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Yamada, Y., Shirahige, K., and Saitou, M. (2013). PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *12*, 368–382.

Yamanaka, Y., Lanner, F., and Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* *137*, 715–724.

Yeo, J.-C., Jiang, J., Tan, Z.-Y., Yim, G.-R., Ng, J.-H., Göke, J., Kraus, P., Liang, H., Gonzales, K.A.U., Chong, H.-C., et al. (2014). Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* *14*, 864–872.

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.

Zhi, X., Zhao, D., Zhou, Z., Liu, R., and Chen, C. (2012). YAP promotes breast cell proliferation and survival partially through stabilizing the KLF5 transcription factor. *Am. J. Pathol.* *180*, 2452–2461.



## 8. 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作製にあたり、終始ご指導を頂きました、筑波大学 医学医療系 高橋 智教授、滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 依馬 正次教授に心から感謝申し上げます。研究手法に関して多くのご指導やアドバイスを頂きました村谷 匡史先生、松本 健博士、和久 剛博士、実験の補助をしていただいた全 孝静さんに深くに感謝いたします。

最後に、修士課程・博士課程の6年間に渡り多くの御指導、御助言をして頂いた筑波大学 医学医療系 解剖学・発生学研究室の皆様、滋賀医科大学 動物生命科学研究センターの皆様、関わっていただいた全ての方に厚く御礼申し上げます。

## 9. 図表

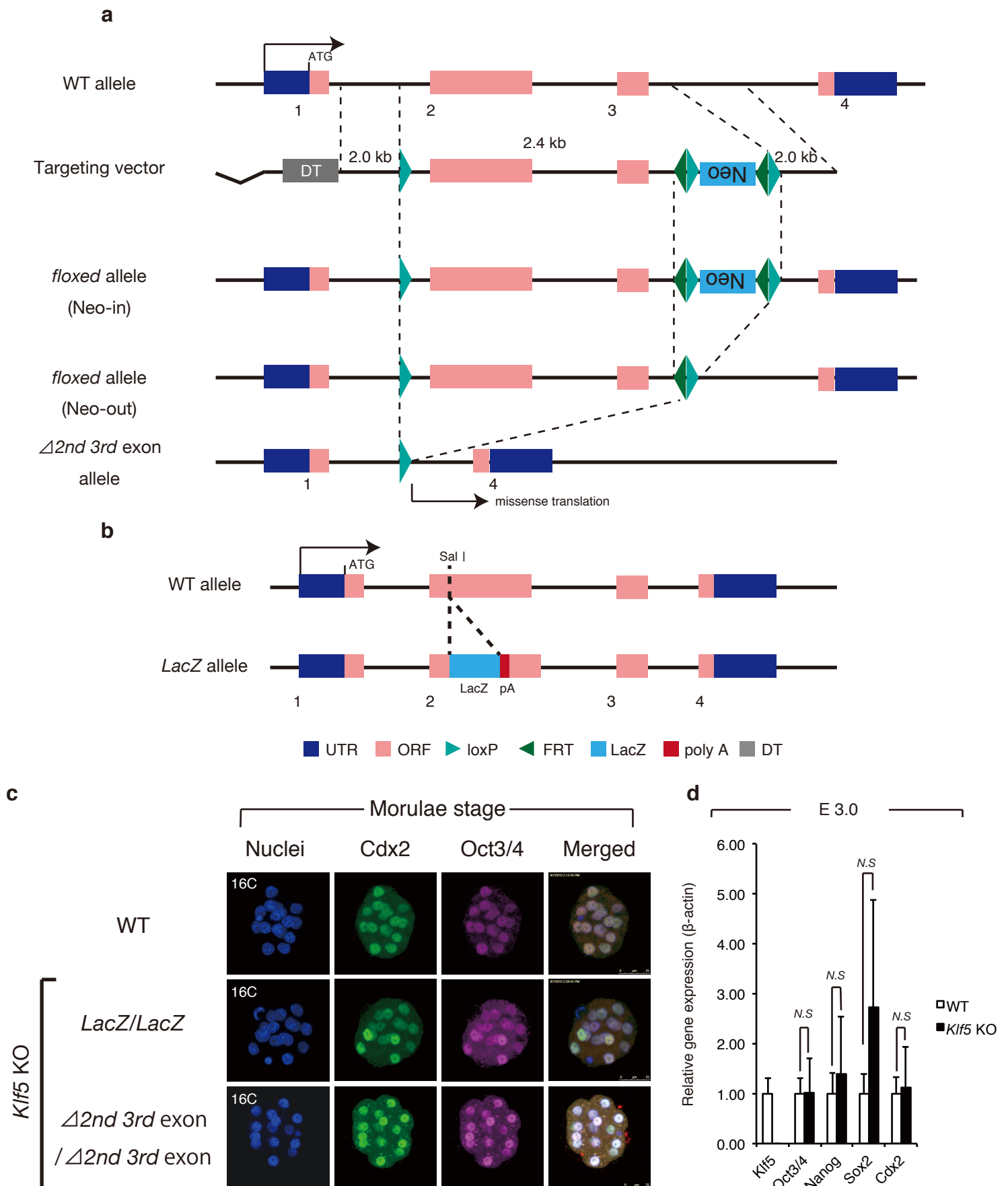


図 1. 本研究で用いた *Klf5* 変異マウス

(a) *Klf5* コンディショナルノックアウトアレル。2 つの loxP 配列を第二、第三エクソンを挟むように挿入した。

(b) *Klf5* LacZ ノックインアレル。

(c) 桑実胚期 WT および *Klf5* KO 胚における Oct3/4、Cdx2 の発現。

(d) E3.0 *Klf5* KO 胚における遺伝子発現解析。

N.S.; Not Significant.

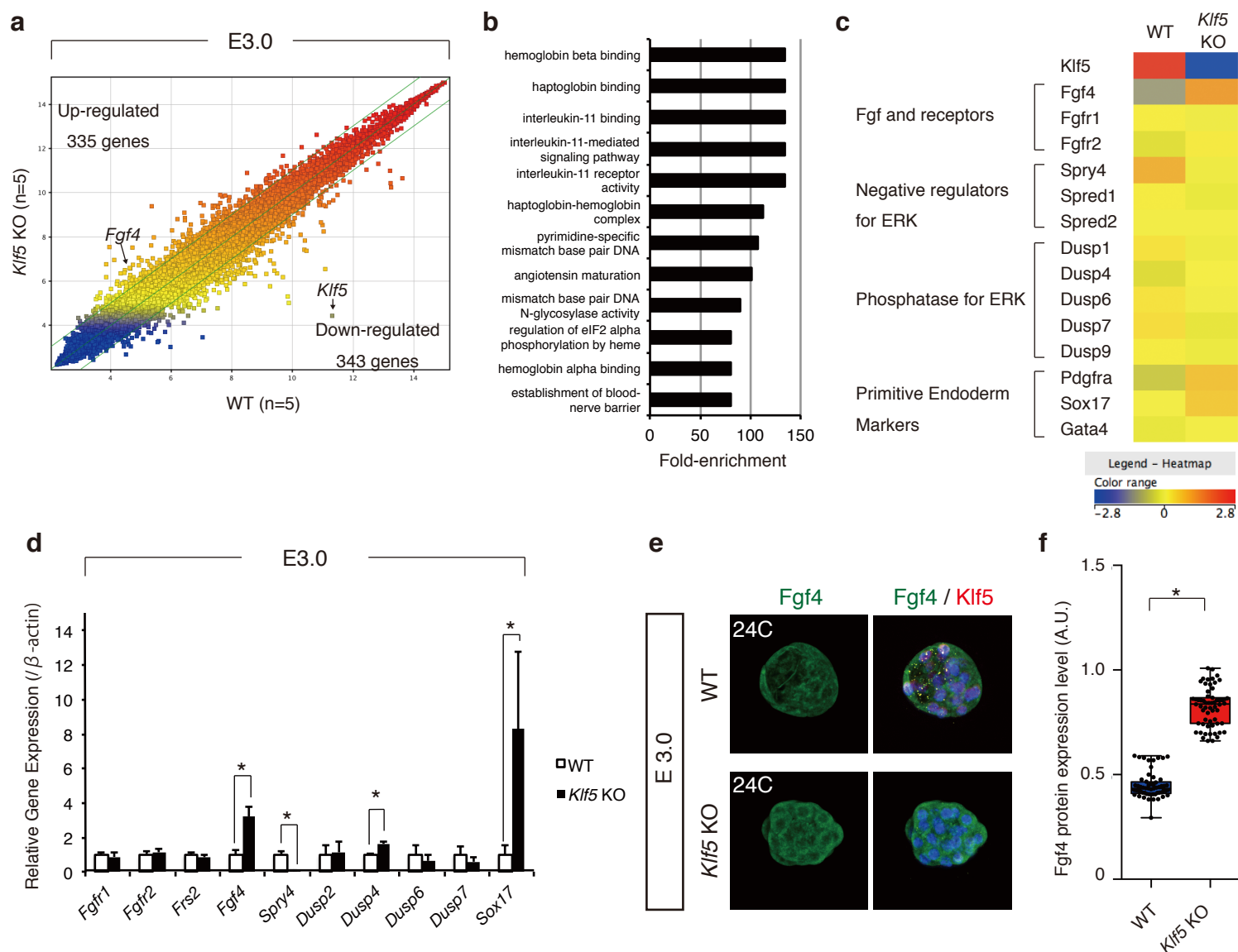


図 2. E3.0 において *Klf5* は *Fgf4* を抑制している。

(a) E3.0 WT 胚と *Klf5* KO 胚のマイクロアレイ結果を scattered plot で示した。

(b) *Klf5* KO 胚で発現が上昇している遺伝子の GO 解析。

(c) *Klf5* KO 胚で発現が上昇・低下している代表的な遺伝子のヒートマップ。

(d) E3.0 *Klf5* KO 胚における遺伝子発現解析。

(e) E3.0 WT と *Klf5* KO 胚における *Fgf4* 発現。

(f) WT と *Klf5* KO 胚における *Fgf4* 発現量を box plot で示した。

A.U.; Arbitrary Unit. \* $P < 0.05$

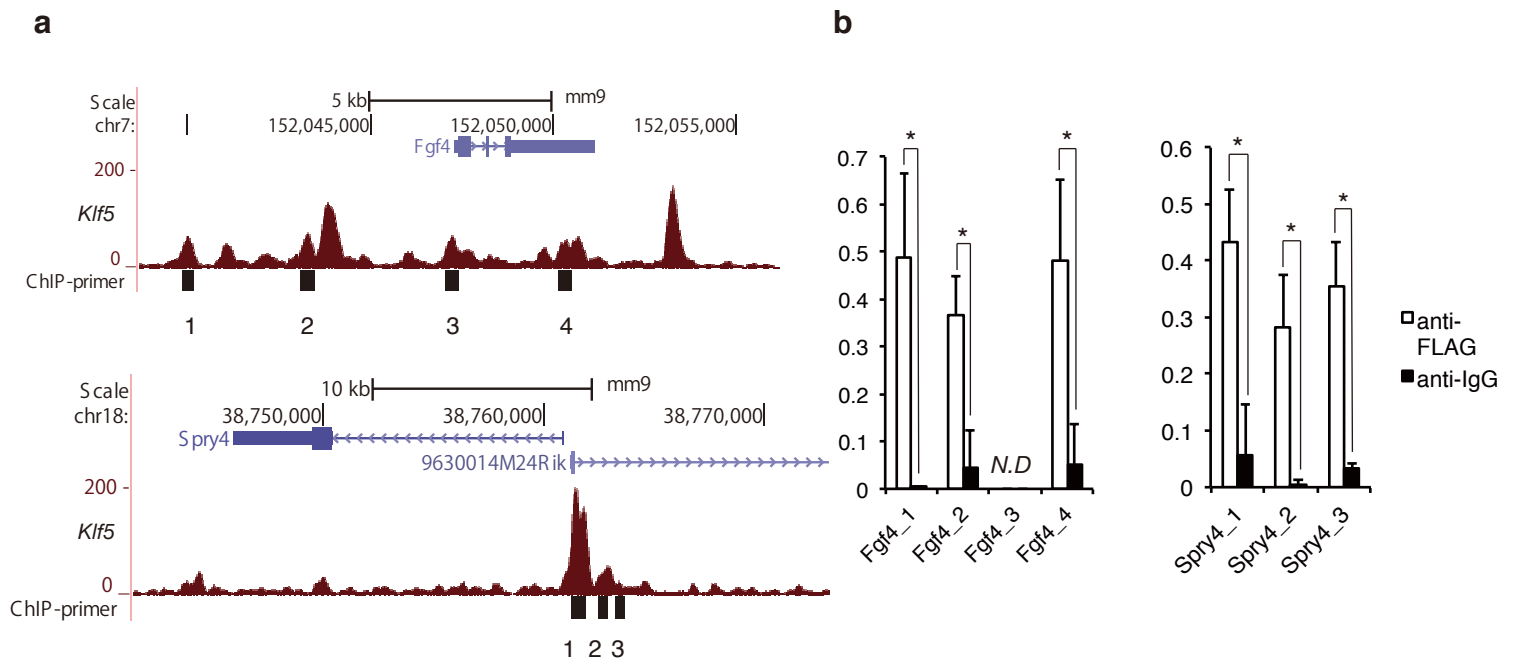


図 3. Klf5 は *Fgf4* および *Spry4* 遺伝子座に結合領域を持つ。

(a) マウス ES 細胞における Klf5 の *Fgf4* と *Spry4* 遺伝子座への結合ピーク。

(b) マウス ES 細胞を用いた Klf5 の *Fgf4* と *Spry4* 遺伝子座に対する ChIP 解析。

N.D.; Not Detected. \*  $P < 0.05$

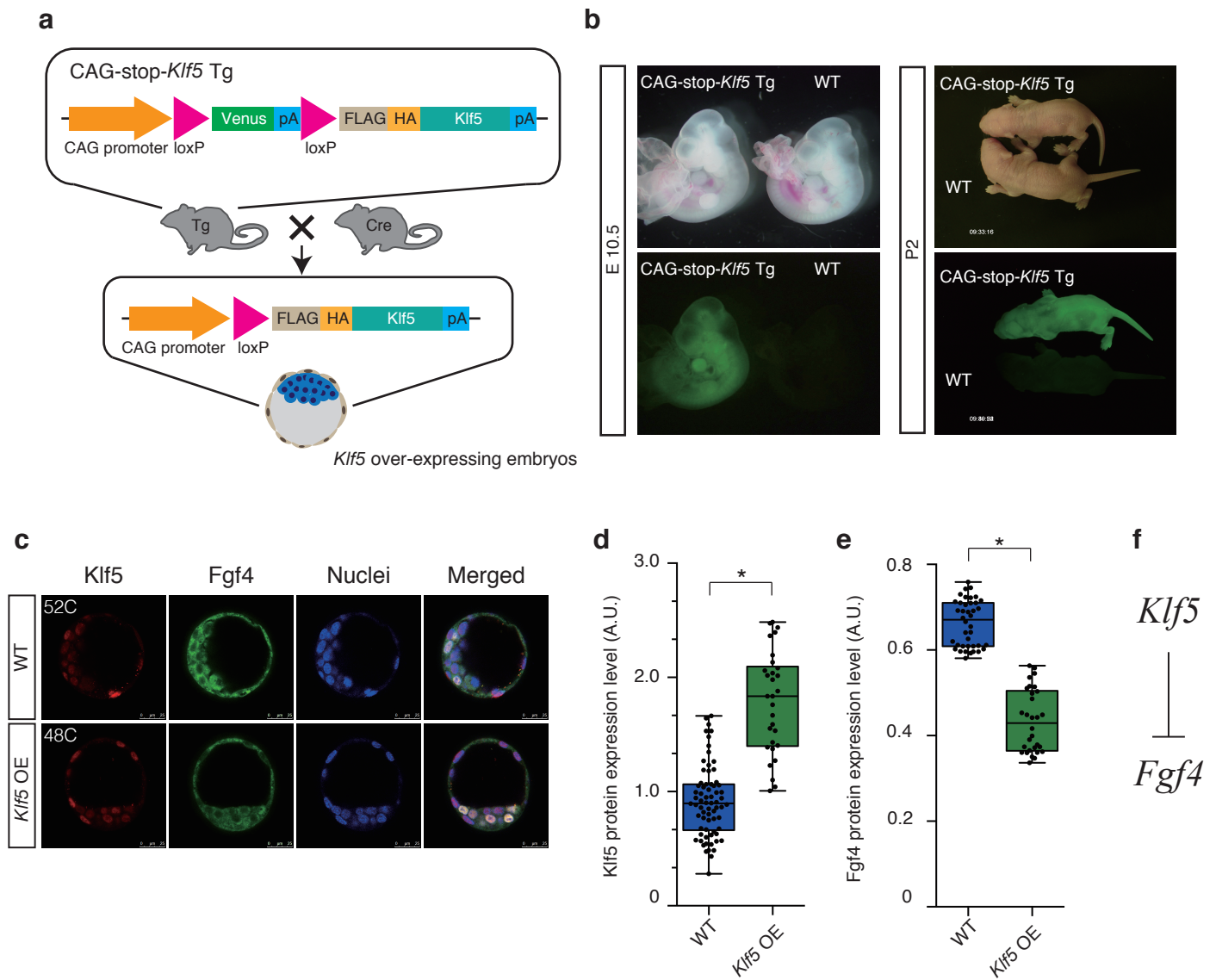


図 4. *Klf5* は胚盤胞において *Fgf4* の発現を抑制するのに十分である。

(a) *Klf5* コンディショナル過剰発現 (CAG-stop *Klf5* Tg) マウスの作製。

(b) 胚発生および出生後における CAG-stop-*Klf5* Tg マウスの Venus の発現。

(c) E3.5 WT および *Klf5* OE 胚における *Klf5* と *Fgf4* の発現。

(d) *Klf5* タンパク発現量の box plot。

(e) *Fgf4* タンパク発現量の box plot。

(f) E3.0-3.25 において *Klf5* は *Fgf4* の発現を直接制御することにより抑制している。

A.U.; Arbitrary Unit. \*P < 0.05

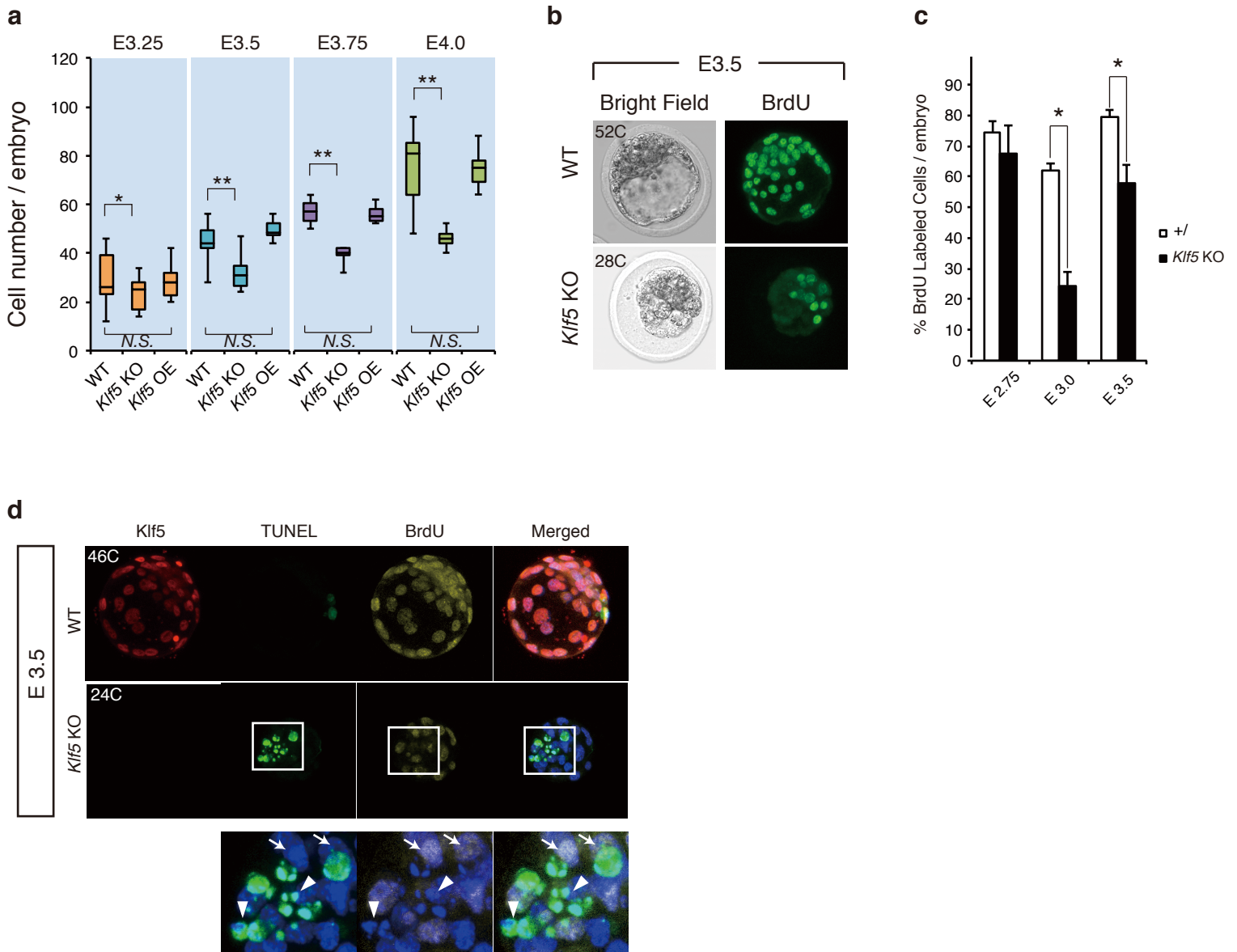


図 5. *Klf5* KO 胚は発生に遅れが見られ、細胞死が誘導されている。

(a) WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚の各発生段階の細胞。

(b) E3.5 WT と *Klf5* KO 胚の BrdU の取込み。

(c) E3.5 WT と *Klf5* KO 胚の BrdU 陽性細胞頻度。

(d) E3.5 WT と *Klf5* KO 胚の TUNEL と BrdU の共染色解析。

矢印は BrdU 陽性 /TUNEL 陰性細胞、矢頭は BrdU 陰性 /TUNEL 陽性細胞を示す。

N.S.; Not Significant. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

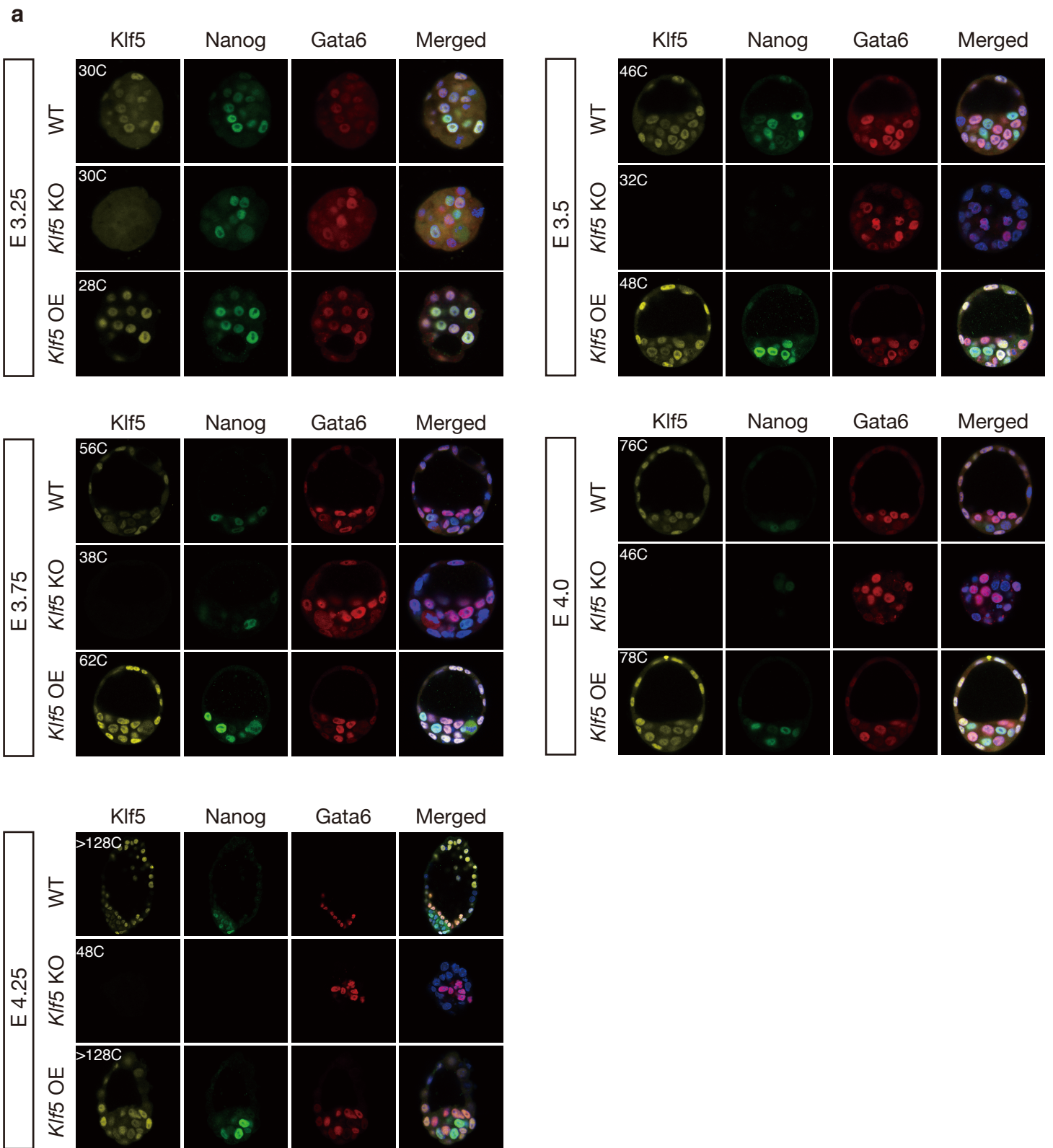


図 6. *Klf5* KO 胚と *Klf5* OE 胚における Epi/PrE 分化の歪み。

(a) E3.25 から E4.25 の WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Nanog と Gata6 の発現を共焦点画像の断面で示した。



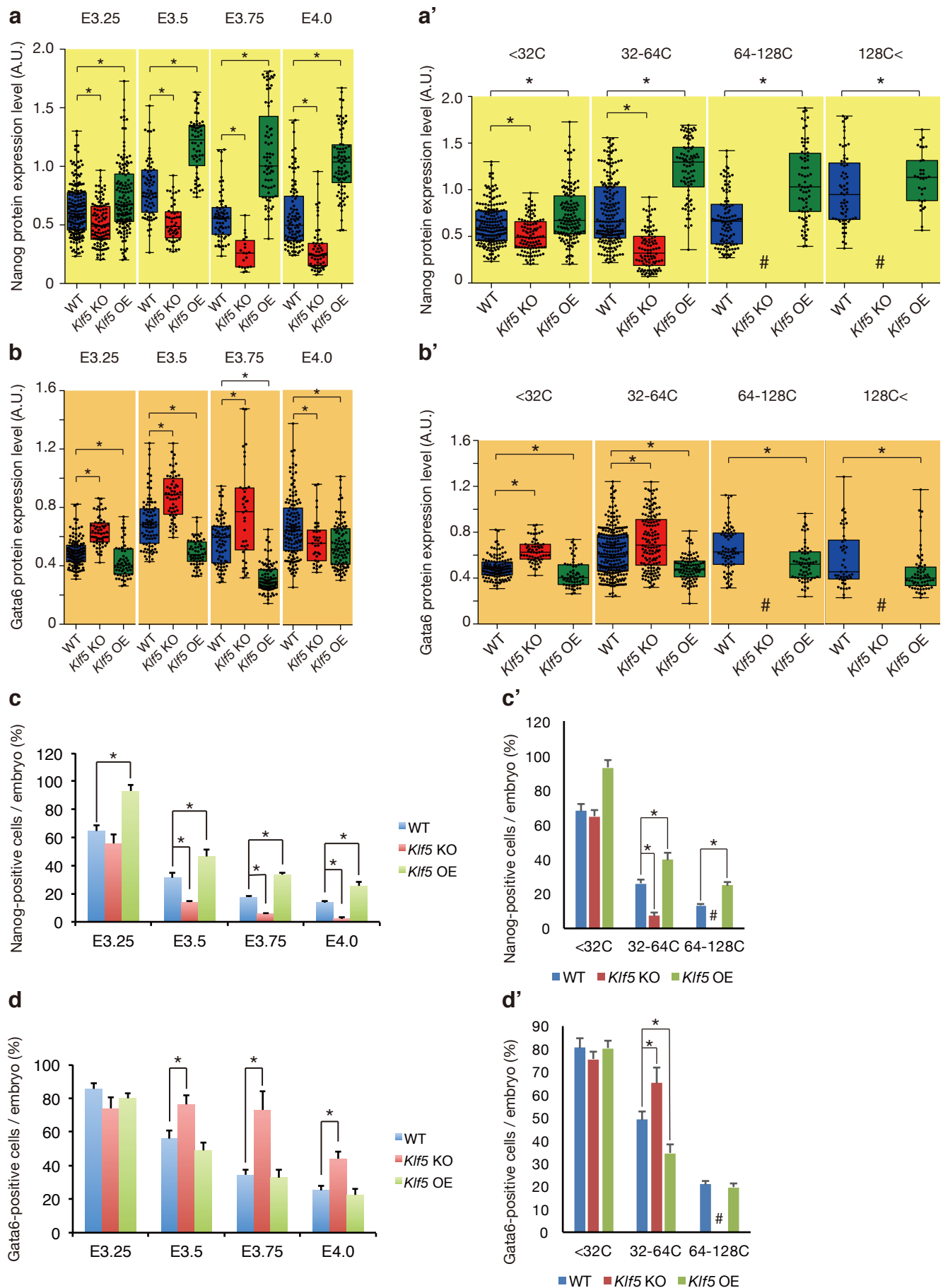


図 7. *Klf5* は *Nanog* の発現を促進し、*Gata6* の発現を抑制している。

(a, a') WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚の各発生段階、細胞数における *Nanog* の発現を box plot で示した。

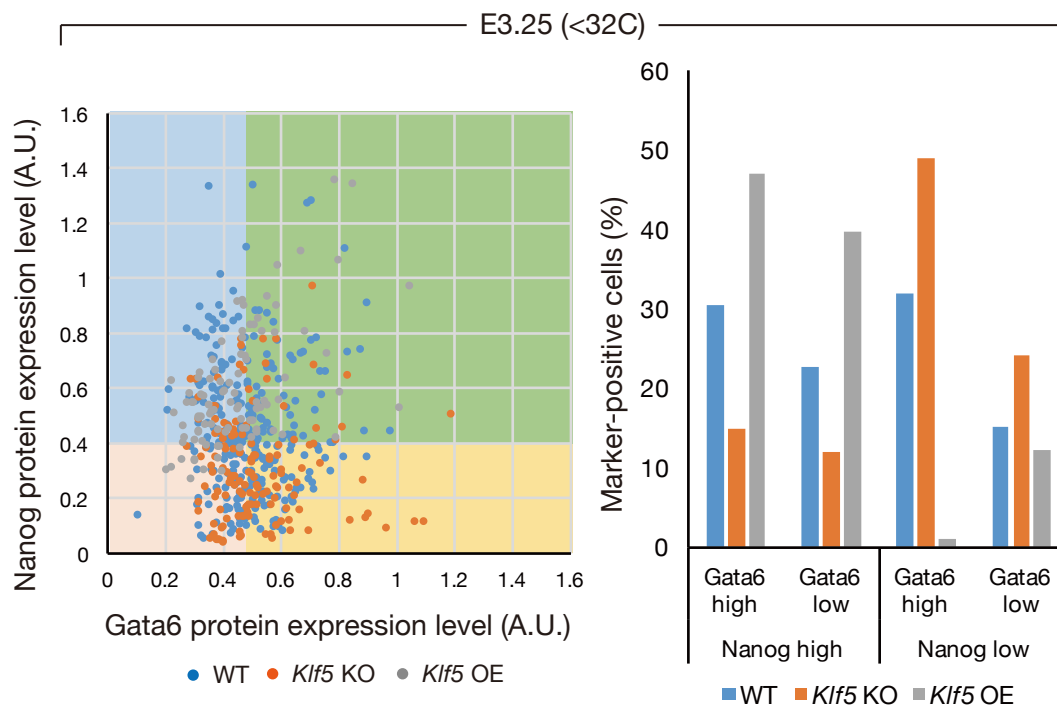
(b, b') WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚の各発生段階、細胞数における *Gata6* の発現を box plot で示した。

(c, c') WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚の各発生段階、細胞数における *Nanog* 陽性細胞頻度。

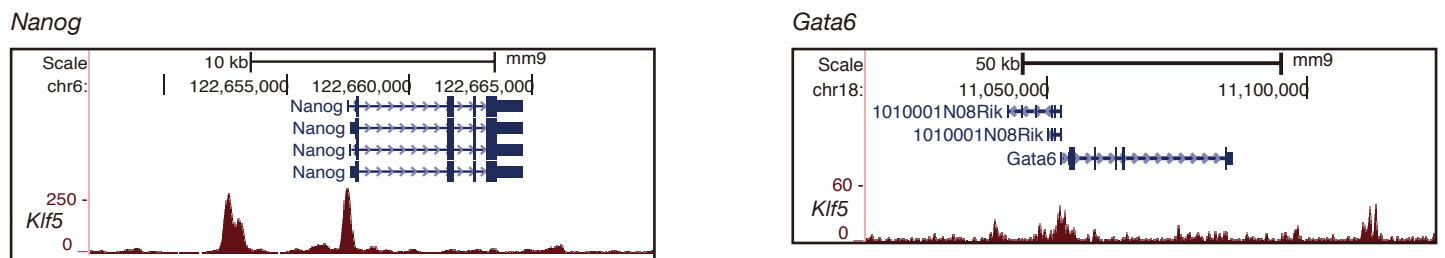
(d, d') WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚の各発生段階、細胞数における *Gata6* 陽性細胞頻度。

#; No Embryo. A.U.; Arbitrary Unit. \* $P < 0.05$

a



b



c

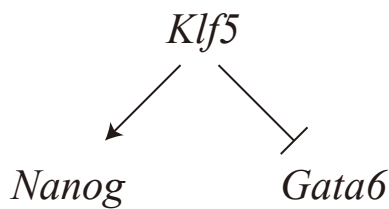


図 8. E3.25 において *Klf5* は Epi と PrE の分化を制御する上流因子である。

(a) E3.25 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚の個々の細胞における *Nanog* と *Gata6* の発現量を scattered plot に示した (左)。

*Nanog* high/low、*Gata6* high/low の閾値は WT 胚の発現量の中央値に設定した。それぞれの細胞集団区画の細胞数の割合を % で示した (右)。

(b) マウス ES 細胞における *Klf5* の *Nanog* と *Gata6* 遺伝子座への結合ピーク。

(c) E3.25 (<32 細胞) において *Klf5* は *Nanog* の発現を促進し、*Gata6* の発現を抑制している。

A.U.; Arbitrary Unit.

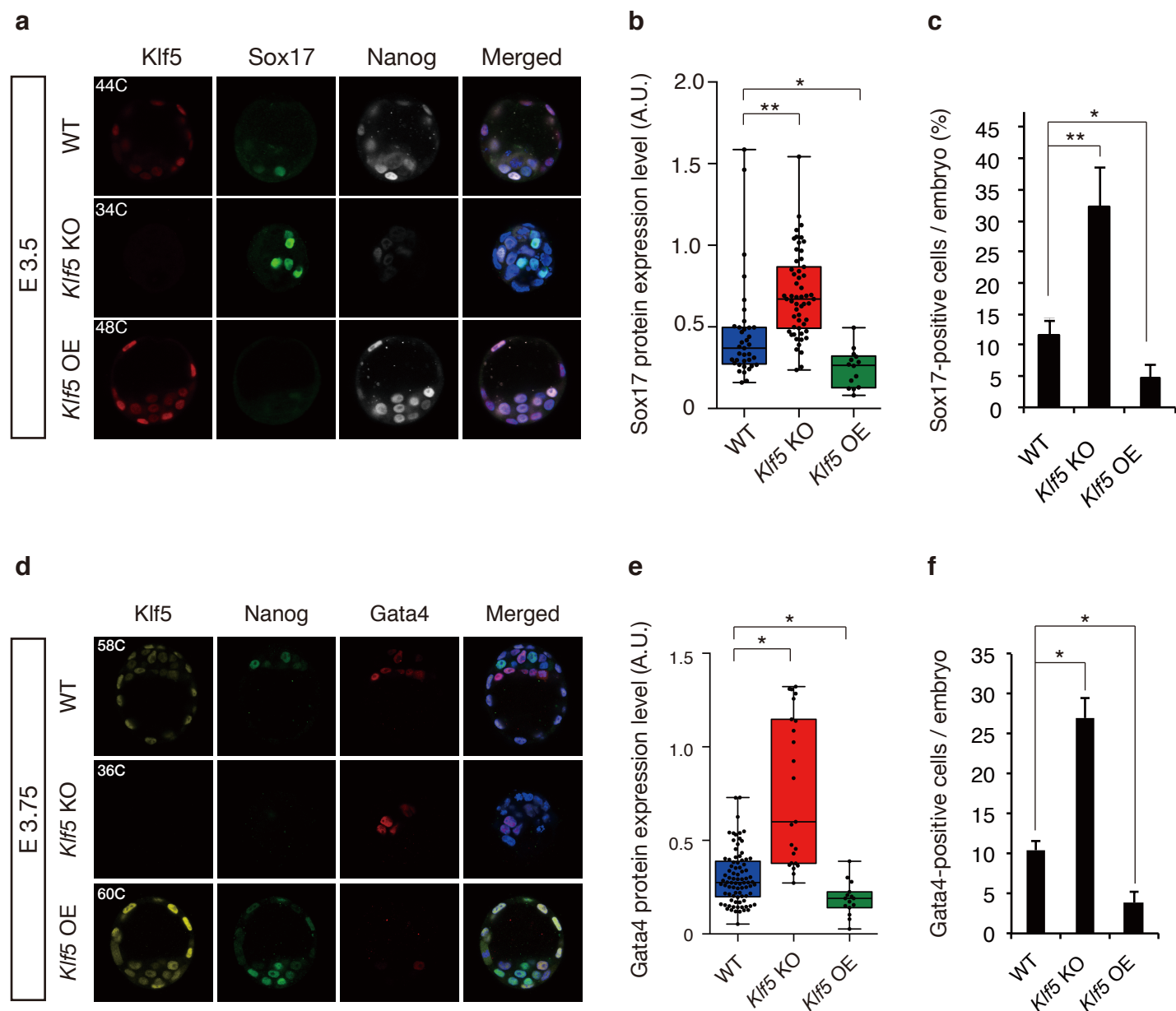


図 9. *Klf5* KO 胚は発 PrE 系列への分化が促進され、*Klf5* OE 胚では抑制されている。

(a) E3.5 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Sox17 と Nanog の発現を共焦点画像の断面で示した。

(b) E3.5 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Sox17 タンパク発現レベルを box plot で示した。

(c) E3.5 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Sox17 陽性細胞頻度。

(d) E3.75 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Gata4 と Nanog の発現を共焦点画像の断面で示した。

(e) E3.75 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Gata4 タンパク発現レベルを box plot で示した。

(f) E3.75 WT/*Klf5* KO/*Klf5* OE 胚における Gata4 陽性細胞頻度。

A.U.; Arbitrary Unit. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

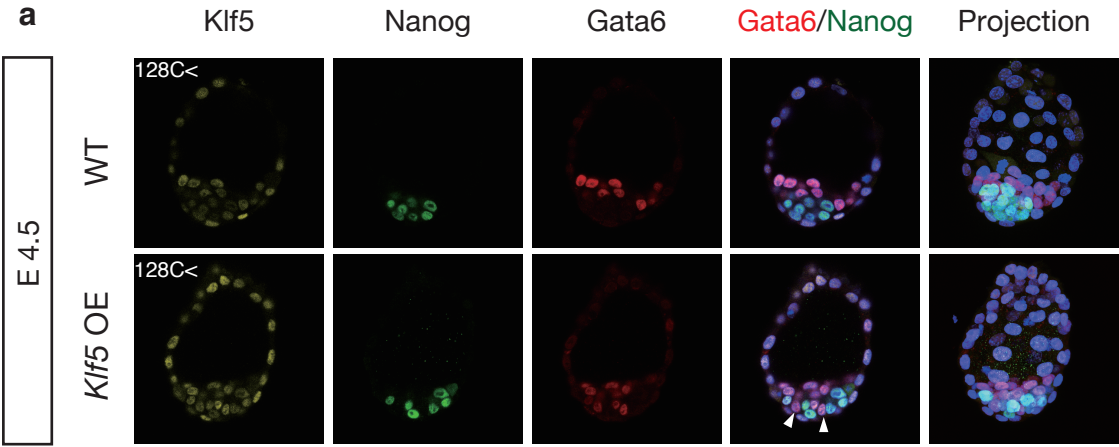


図 10. E4.5 *Klf5* OE 胚では *Gata6* 陽性細胞の局在化が見られない。  
(a) E4.5 の WT/*Klf5* OE 胚における *Nanog* と *Gata6* の発現を共焦点画像の断面で示した。  
矢頭は *Klf5* OE 胚の ICM で局在化していない *Gata6* 陽性細胞を示した。

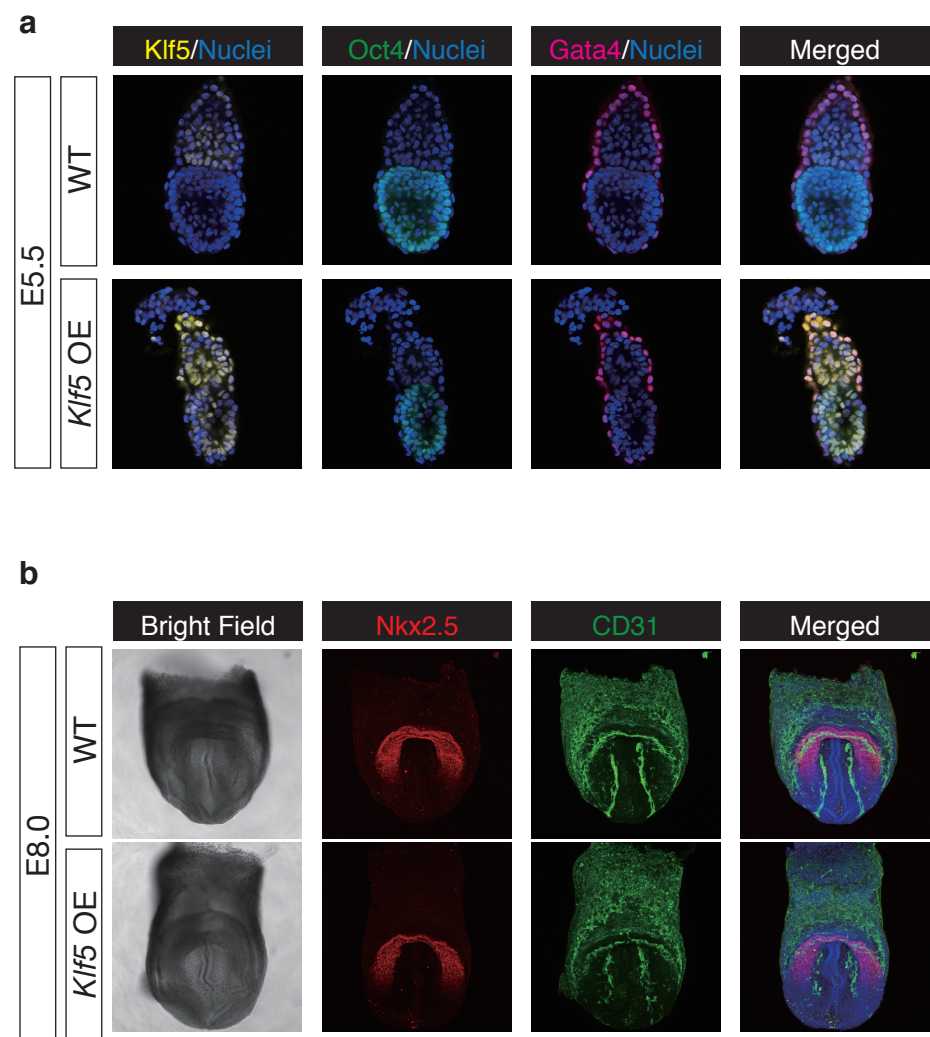


図 11. *Klf5* OE 胚は正常に発生する。  
(a) E5.5 WT/*Klf5* OE 胚における Oct3/4 と Gata4 の発現を共焦点画像の断面で示した。  
(b) E8.0 WT/*Klf5* OE 胚における Nkx2.5 と Cd31 の発現を共焦点画像で示した。

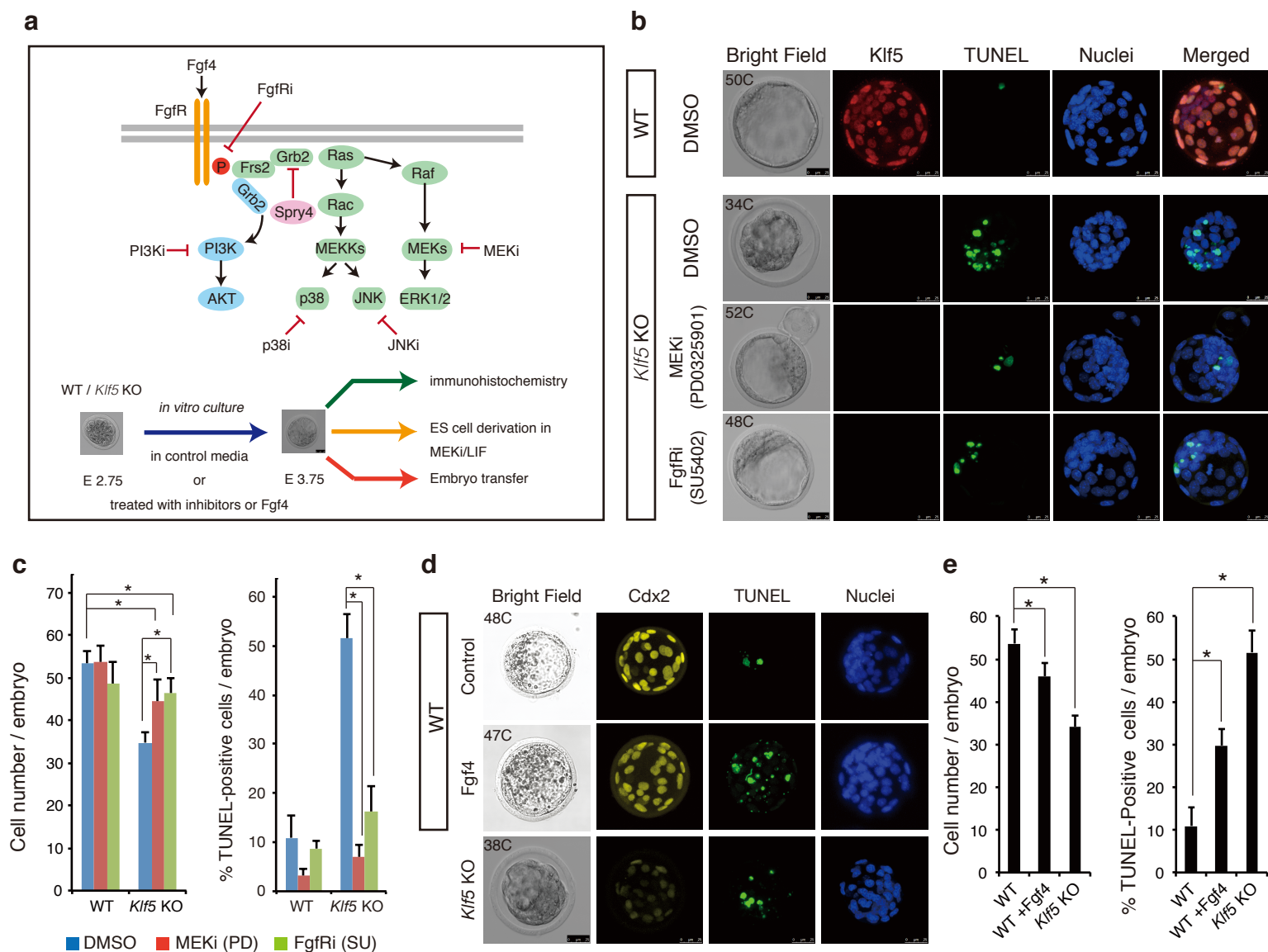


図 12. Fgf-ERK 経路の阻害は *Klf5* KO 胚の細胞増殖をレスキューする。

(a) *Klf5* KO 胚における Fgf-ERK 経路の阻害と、実験の概略。

(b) *Klf5* KO 胚における MEK 阻害剤と FgfRi 阻害剤の効果。

E2.75 から阻害剤存在下で 24 時間培養した胚の TUNEL 染色の共焦点画像を projection 画像で示した。

(c) MEK 阻害剤および FgfRi 阻害剤存在下で 24 時間培養した胚の細胞数（左）と TUNEL 陽性細胞頻度（右）。

(d) E2.75 から 24 時間 Fgf4 存在下で培養した胚の Cdx2 の発現と TUNEL 染色の共焦点画像を projection 画像で示した。

(e) Fgf4 存在下で 24 時間培養した胚の細胞数（左）と TUNEL 陽性細胞頻度（右）。

\* $P < 0.05$



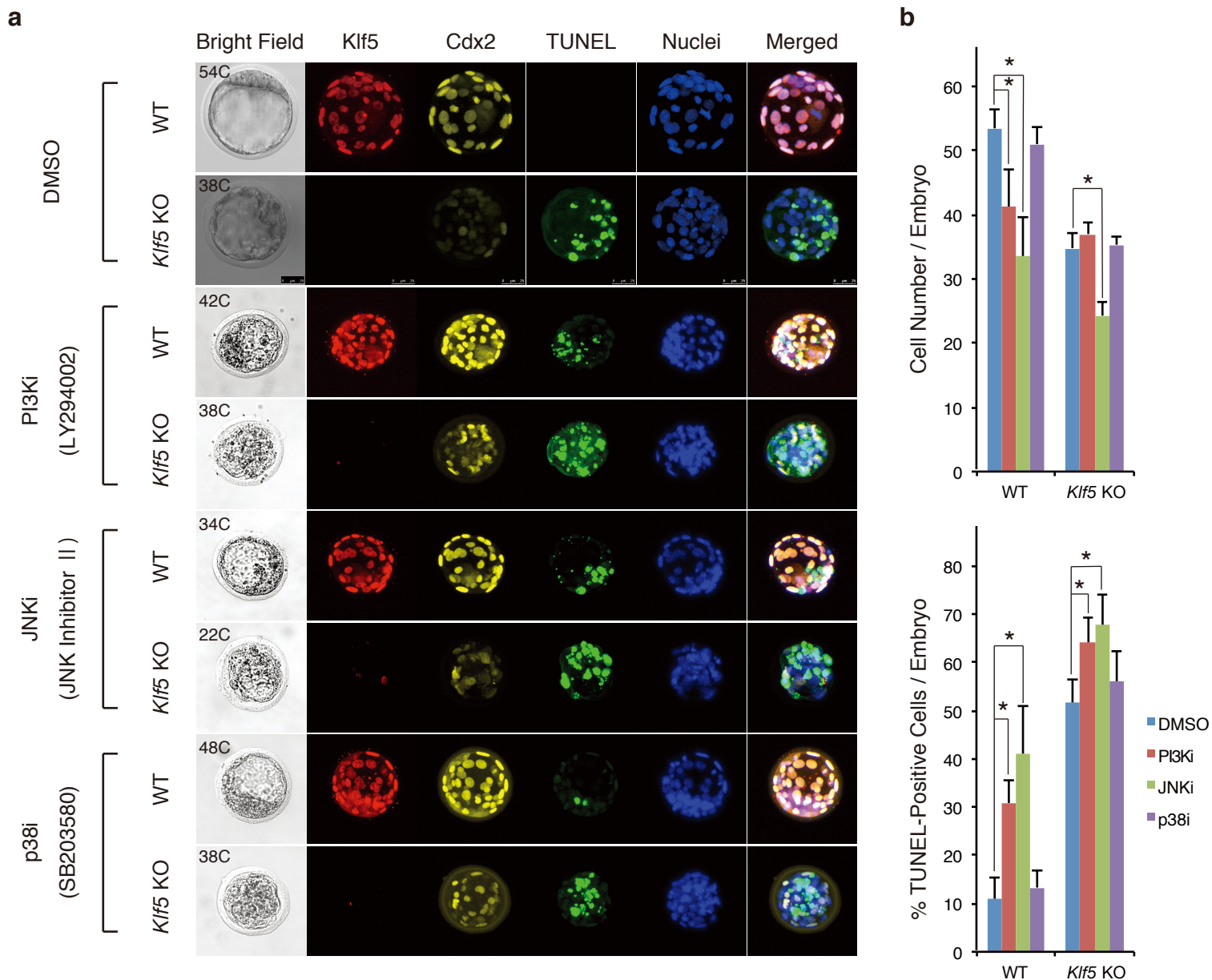


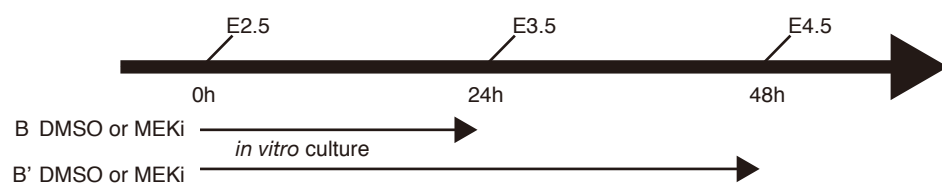
図 13. JNK、p38、PI3K の阻害による *Klf5* KO 胚の表現型。

(a) 各阻害剤存在下で E2.75 から 24 時間培養後の胚の *Klf5* と *Cdx2* の発現と TUNEL 染色の共焦点画像を projection 画像で示した。

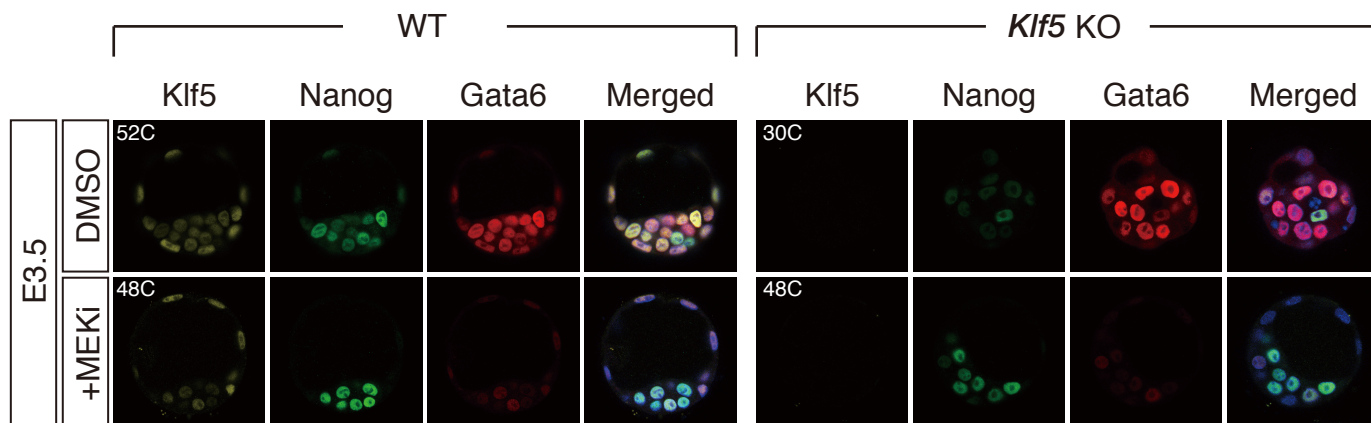
(b) 各阻害剤存在下で 24 時間培養した胚の細胞数（上）と TUNEL 陽性細胞頻度（下）。

\* $P < 0.05$

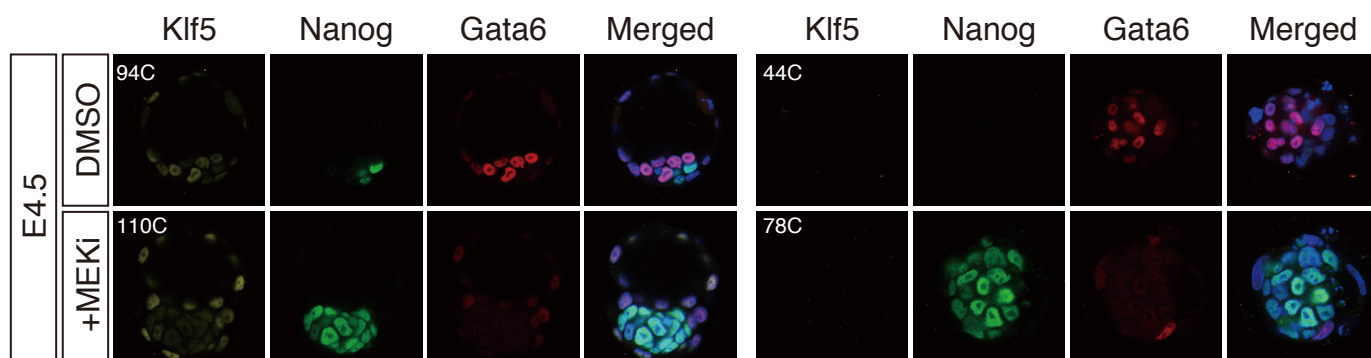
a



b



b'



c

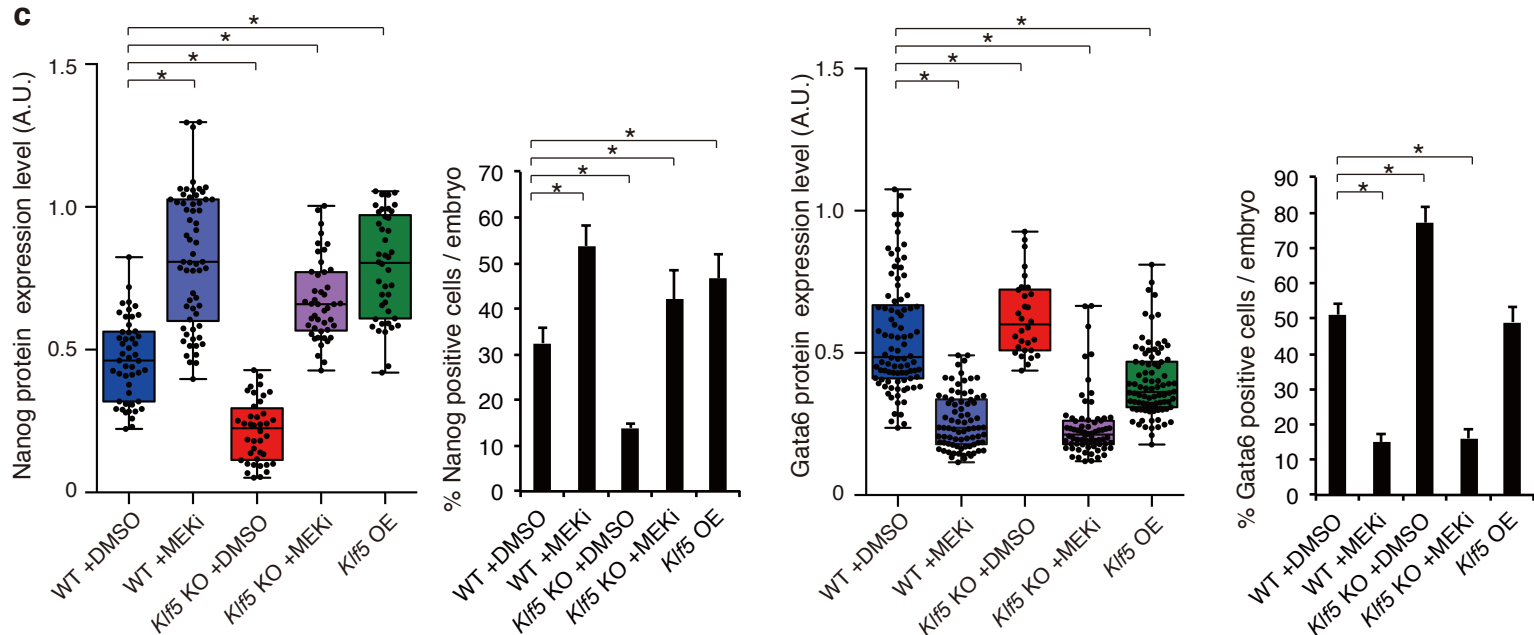


図 14. Fgf-ERK 経路の障害は *Klf5* KO 胚における PrE への分化の歪みをレスキューする。

(a) *Klf5* KO 胚における Fgf-ERK 経路の障害と、実験の概略。

(b, b') *Klf5* KO 胚を MEK 阻害剤存在下で 24 時間 (b) または 48 時間 (b') 培養後の Nanog と Gata6 の発現。

(c) MEK 阻害剤存在下で培養した胚の Nanog と Gata6 のタンパク発現レベル (左) と陽性細胞頻度 (右)。



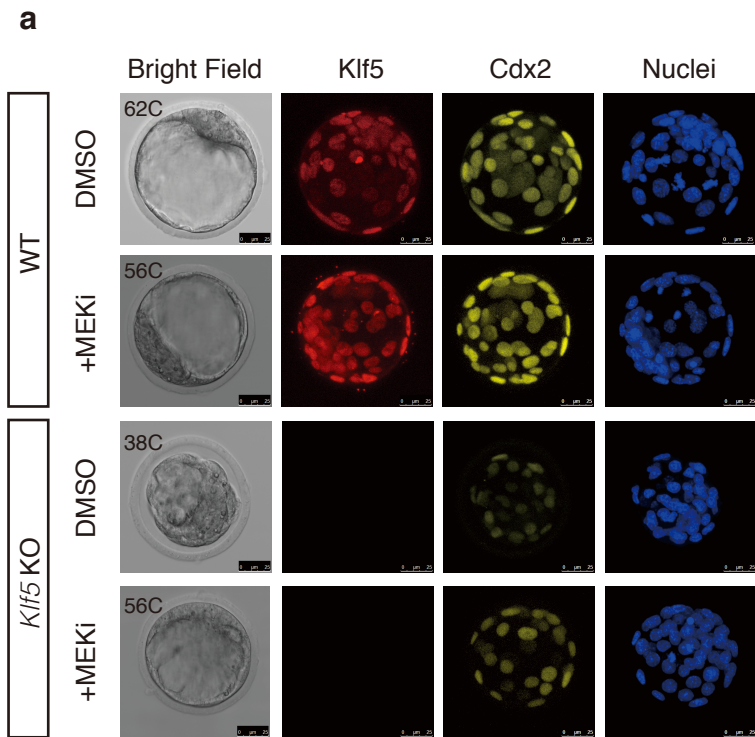


図 15. *Klf5* KO 胚の Fgf-ERK 経路の阻害は *Cdx2* の発現をレスキューできない。

(a) MEK 阻害剤存在下で E2.75 から 24 時間培養した WT および *Klf5* KO 胚における *Klf5* と *Cdx2* の発現を共焦点画像の projection 画像で示した。

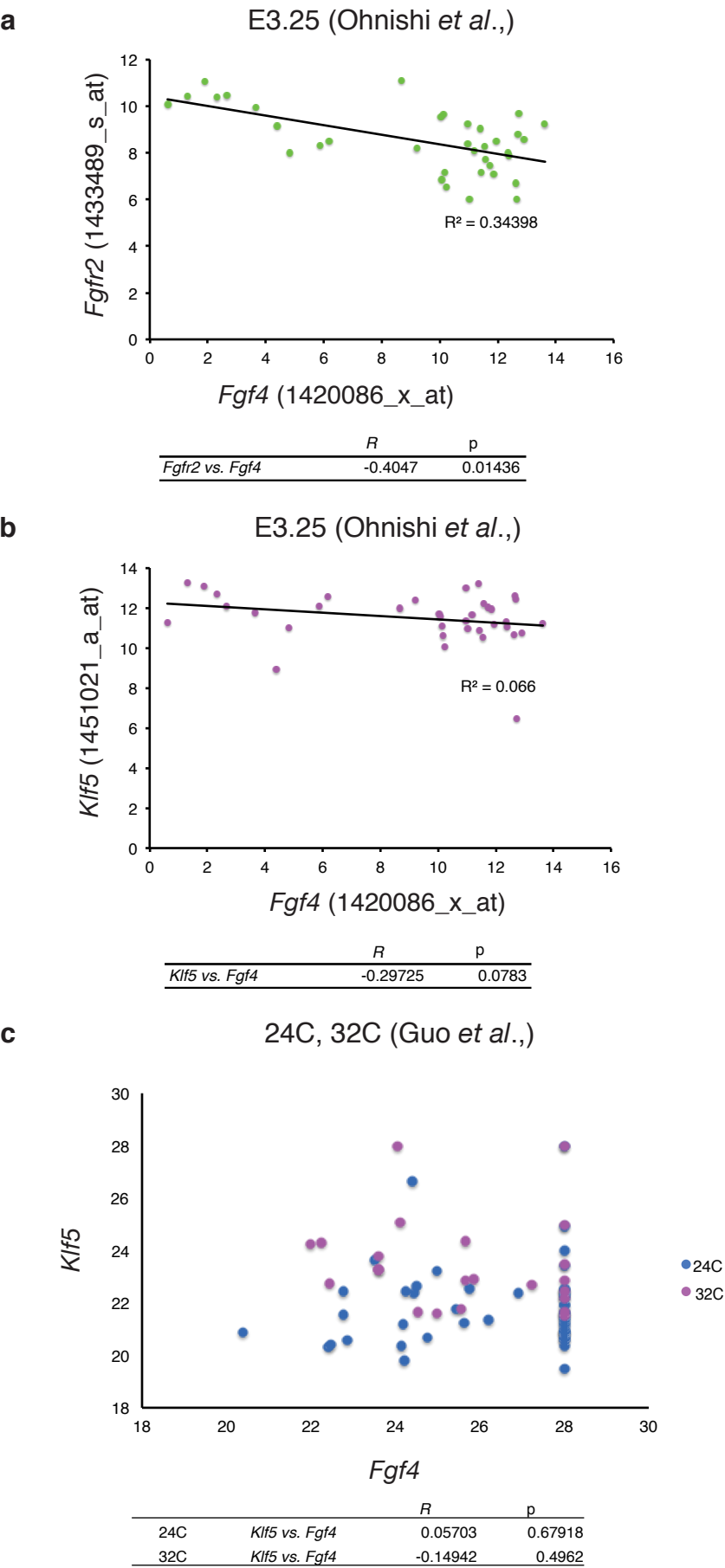


図 16. E3.25 において *Klf5* と *Fgf4* の発現に相関は見られない。  
E3.25 (>32 細胞) WT 胚の個々の細胞における *Fgfr2/Fgf4* (a)、*Klf5/Fgf4* (b, c) の mRNA 発現を scattered plot で示した。Ohnishi らのデータは E3.25 WT 胚の ICM に由来する単一細胞 mRNA 発現である。Guo らのデータは E3.25 (24-32 細胞) WT 胚の単一細胞に由来するマイクロアレイ解析結果である。  
*R*; Pearson' s correlation efficient.

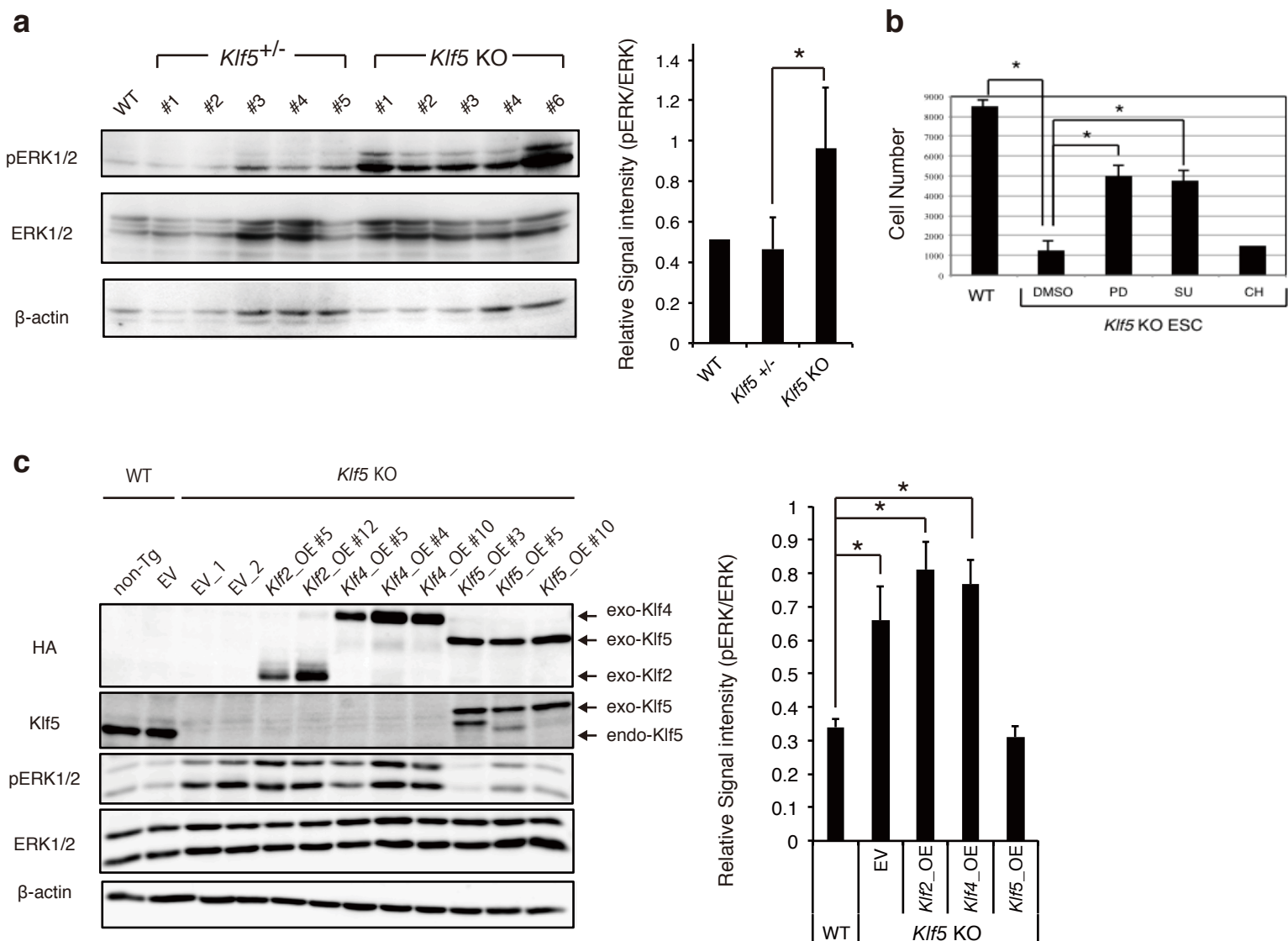


図 17. *Klf5* はマウス ES 細胞において Fgf-ERK 経路を制御している。

(a) WT/*Klf5*<sup>+/-</sup>/*Klf5* KO ES 細胞における pERK、ERK、β-actin のウェスタンブロッティング (左)。

pERK のシグナル強度は ERK のシグナル強度で補正して比較した (右)。

(b) *Klf5* KO ES 細胞を Fgfr、MEK、GSK3 阻害剤存在下で培養後の細胞増殖能。WT ES 細胞および *Klf5* KO ES 細胞を播種し、DMSO、MEK 阻害剤 (PD)、Fgfr 阻害剤 (SU)、GSK3β阻害剤 (CH) 存在下で 48 時間培養後の細胞数を計測した。

(c) HA タグを付加した *Klf2*、*Klf4*、*Klf5* を過剰発現させた *Klf5* KO 胚における *Klf5*、HA、pERK、ERK、β-actin のウェスタンブロッティング (左)。 pERK のシグナル強度は ERK のシグナル強度で補正して比較した (右)。

EV; empty vector. \**P* < 0.05

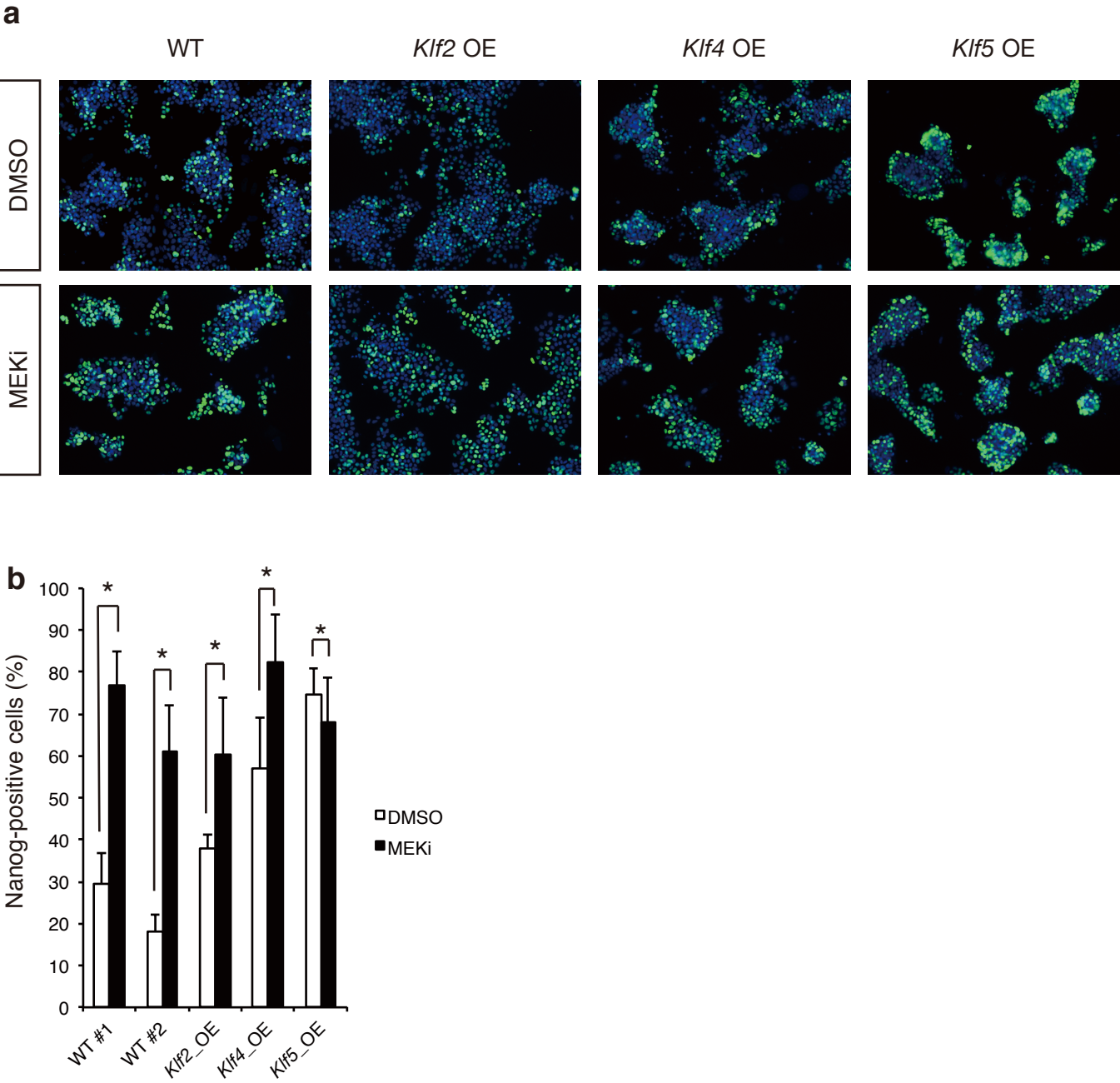
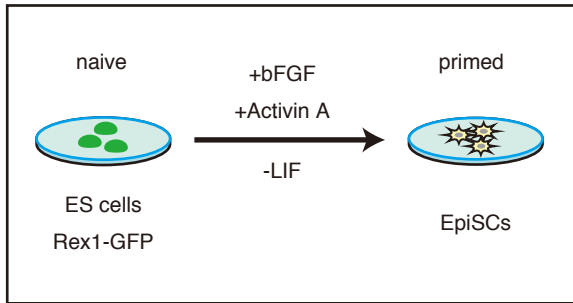


図 18. マウス ES 細胞における *Klf5* の過剰発現は MEK 阻害と同様に均一な Nanog の発現をもたらす。MEK を阻害した WT と *Klf*- 過剰発現 ES 細胞における Nanog の発現 (a) および陽性細胞頻度 (b)。\* $P < 0.05$

**a**



**b**

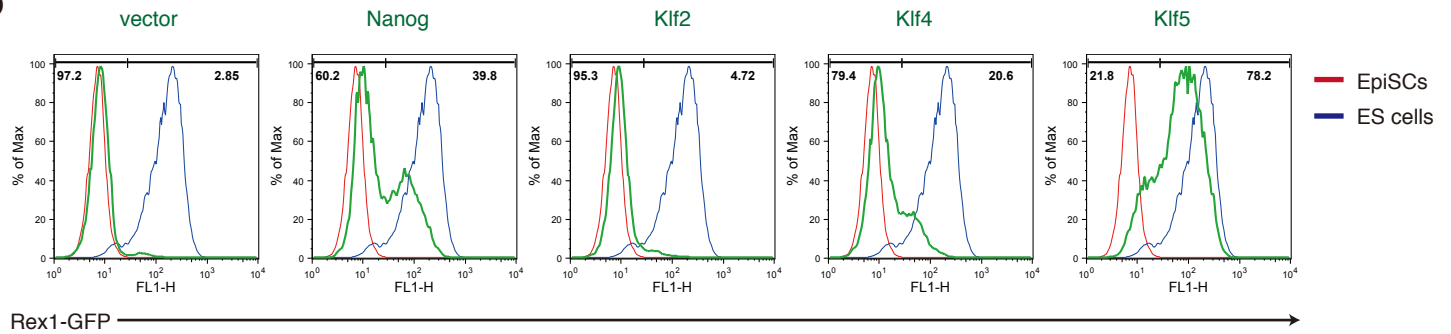


図 19. *Klf5* 過剰発現 ES 細胞は EpiSC への分化に抵抗性を示す。

(a) マウス ES 細胞の EpiSC への分化誘導。

(b) EpiSC へ分化誘導後の Rex1-GFP 発現のフローサイトメリー解析。陽性コントロールとして Rex1-GFP ES 細胞、陰性コントロールとして EpiSC を用いた。

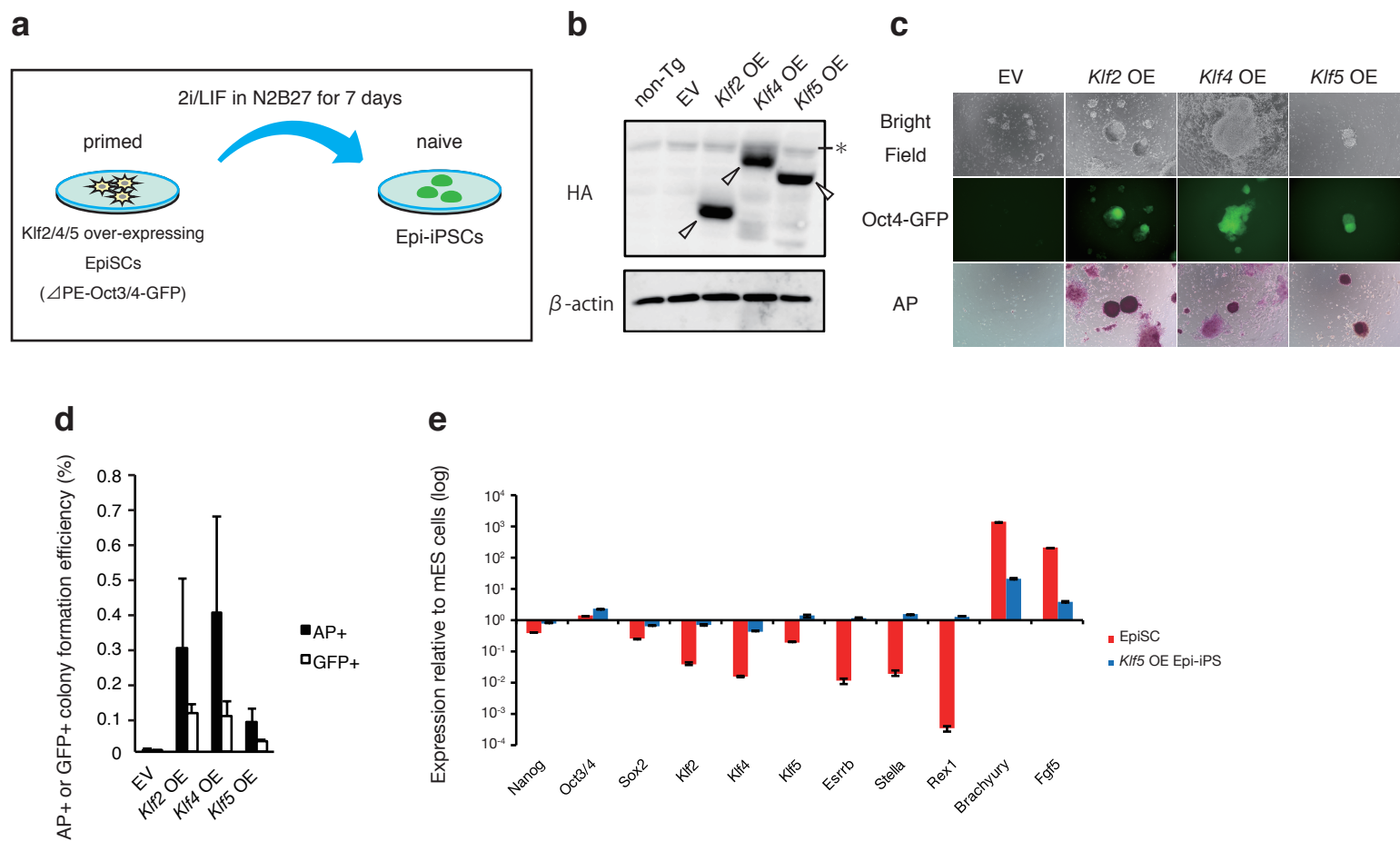


図 20. *Klf5* は 2i/LIF 培養条件で EpiSC を naive 状態に初期化する。

(a) *Klf* による EpiSC の初期化誘導。

(b) HA タグを付加した *Klf* を過剰発現した EpiSC における HA と  $\beta$ -actin のウェスタンブロッティング。  
矢頭は外因性 *Klf* の発現、\* は非特異的シグナルを示す。

(c) 初期化誘導後得られた Epi-iPS の明視野、Oct4-GFP 発現および Alkaline Phosphatase (AP) assay。

(d) 2i/LIF 条件における初期化効率。

(e) *Klf5* OE EpiSC を 2i/LIF 条件で初期化して得られた Epi-iPS の遺伝子発現。

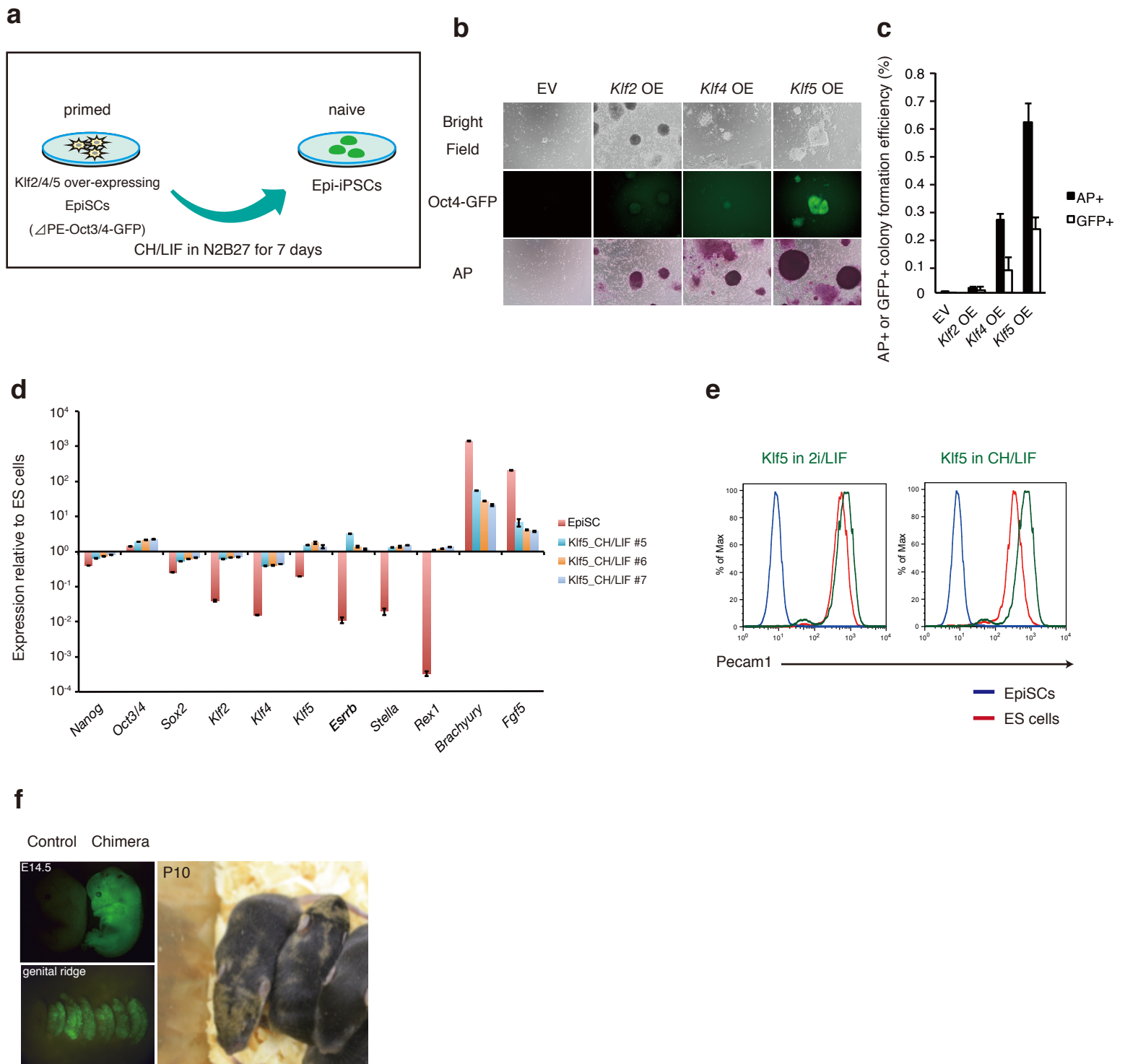


図 21. *Klf5* は GSK3 阻害と協調して EpiSC の naïve 状態への初期化を促進する。

(a) *Klf* と CH/LIF 培養条件における EpiSC の初期化誘導。

(b) 初期化誘導後得られた Epi-iPS の明視野、Oct4-GFP 発現および Alkaline Phosphatase (AP) assay。

(c) CH/LIF 条件における初期化効率。

(d) *Klf5* OE EpiSC を CH/LIF 条件で初期化して得られた Epi-iPS の遺伝子発現。

(e) *Klf5* OE EpiSC を 2i/LIF 条件および CH/LIF で初期化して得られた Epi-iPS の Pecam1 発現のフローサイトメトリー解析。

(f) *Klf5* OE EpiSC を CH/LIF 条件で初期化して得られた Epi-iPS のキメラ貢献能。E14.5 胚の全身および生殖隆起 (genital ridge)、新生仔キメラマウス。



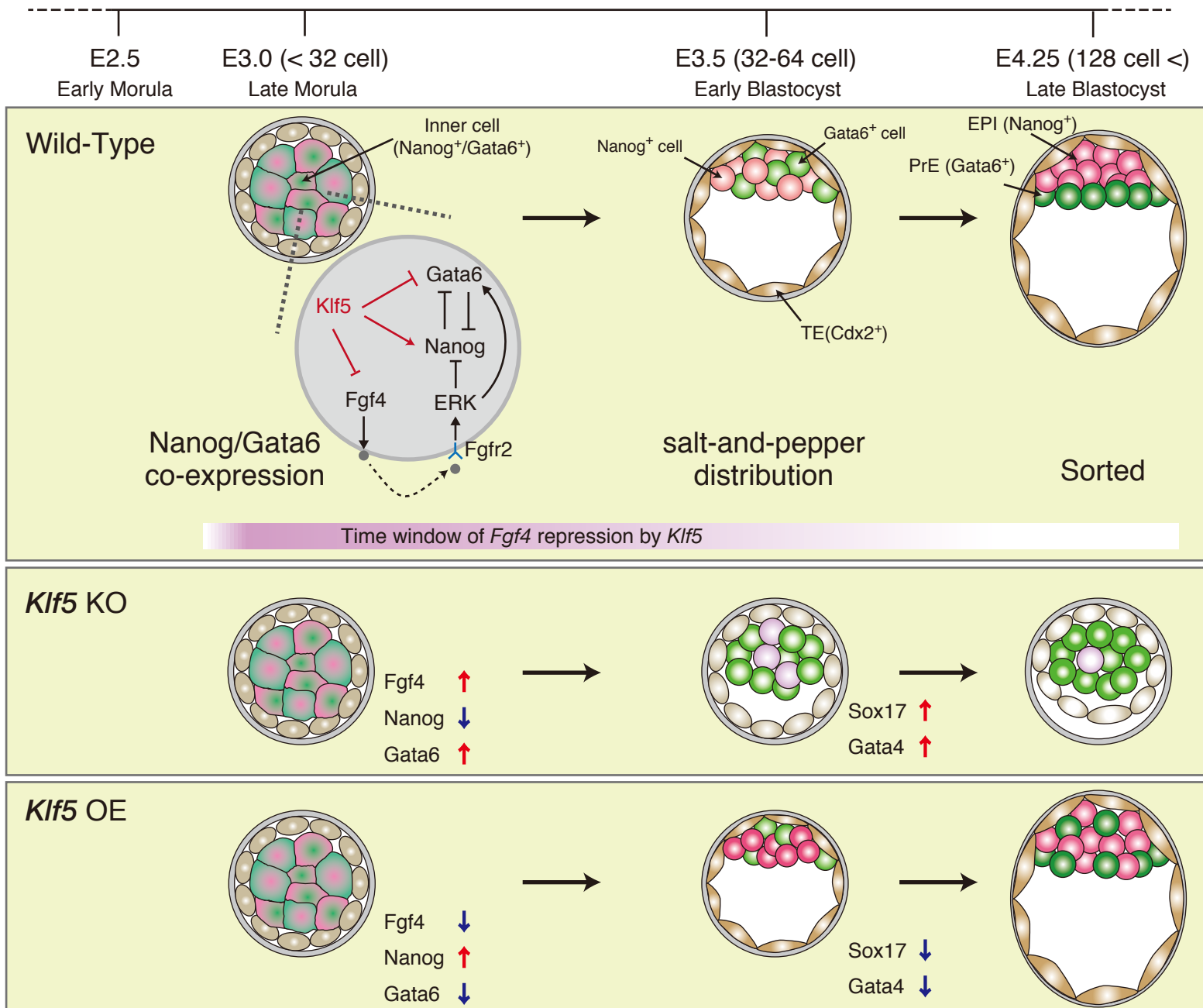


図 22. *Klf5* は Epi と PrE 分化のバランスを制御する上流因子である。

E3.0-3.25 (>32 細胞) において、ICM の細胞は *Nanog* と *Gata6* を確率論的に共発現しており、二分化能を保持している。E3.5-3.75 では、ICM のそれぞれの細胞で *Nanog* と *Gata6* を排他的に発現する、salt-and-pepper の発現様式が形成されており、*Nanog* 陽性細胞は Epi へ、*Gata6* 陽性細胞は PrE へ分化が決まりつつ有る。E4.0-4.25 まで発生が進むと、*Gata6* 陽性細胞は胞胚腔側へ局在化 (sorting) することにより一層の上皮組織である PrE を形成し、PrE の内側に *Nanog* 陽性の Epi が形成される。*Fgf4*-ERK 経路は初期の確立論的な *Nanog* と *Gata6* の発現には関与していないが、*Fgf4*-ERK 経路の活性化は *Nanog* の発現を抑制し、*Gata6* の発現を促進する。その結果、*Nanog* と *Gata6* の salt-and-pepper の発現様式が形成される。E3.0 *Klf5* KO 胚では *Fgf4* の発現が上昇しており、E3.25 では *Gata6* の発現が上昇しており、*Nanog* の発現が誘導されている。一方、E3.25 *Klf5* OE 胚では *Nanog* の発現が上昇し、*Gata6* の発現が抑制されていた。従って、初期の *Nanog* と *Gata6* の発現は *Fgf4*-ERK 経路に独立して共発現状態が形成されることから、*Klf5* はこの発生段階で *Nanog* と *Gata6* をそれぞれ制御していると考えられる。また、E3.75 *Klf5* KO 胚の ICM の大部分は *Gata6* 陽性であり、*Gata4* の発現も上昇しているが、MEK の阻害により、PrE 系列への分化を Epi へ逆転させられることから、*Klf5* は *Fgf*-ERK 経路を抑制することにより、*Nanog* 陽性の多能性エピブラストの発生を保障していると考えられる。



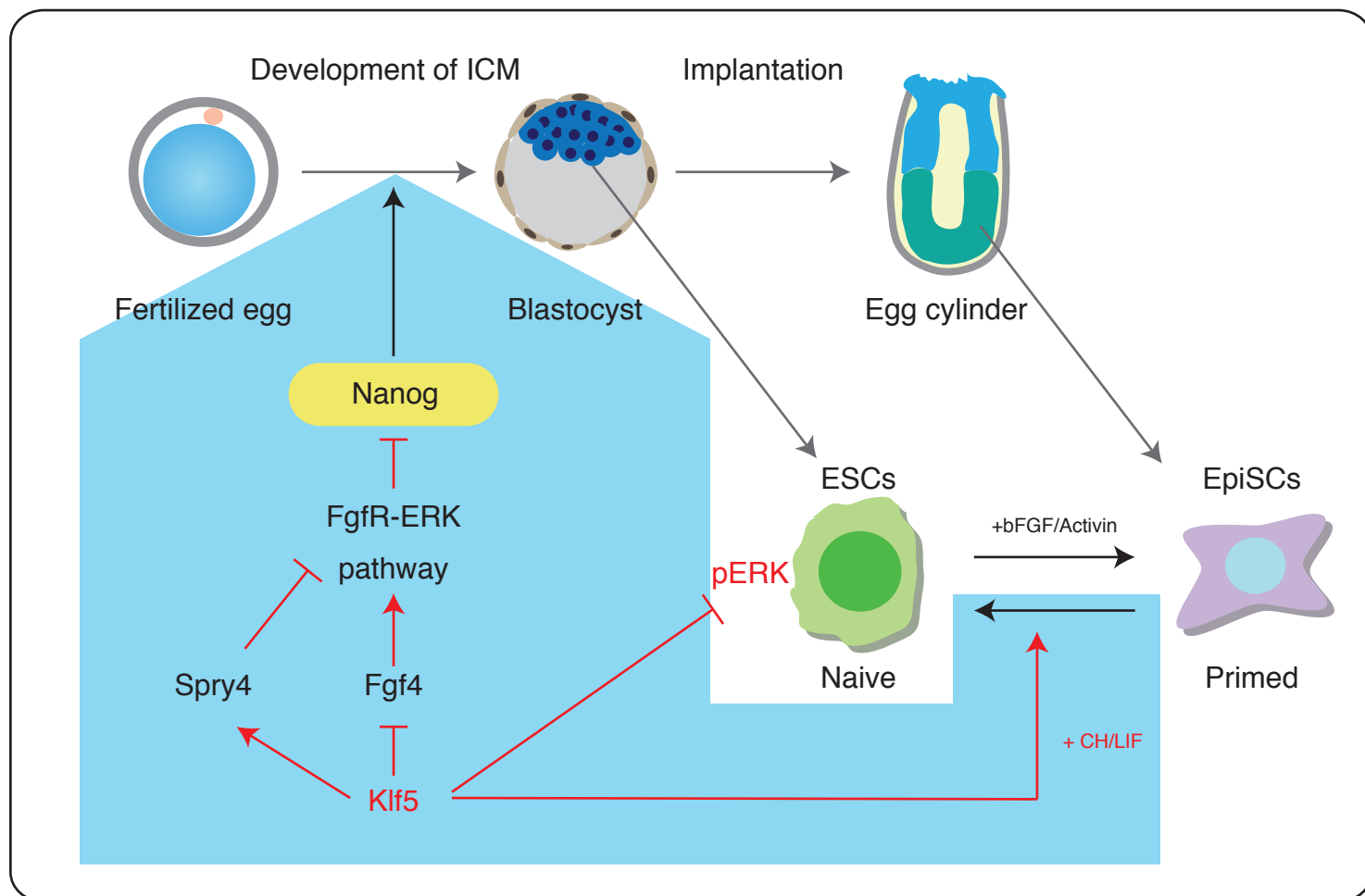


図 23. *Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することにより naïve 状態の多能性を保障している。

*Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することにより、細胞増殖と多能性を維持している。*Klf5* は 2i/LIF 培養条件で EpiSC を naïve 状態へ初期化させることができる。さらに、*Klf5* は MEK 阻害剤を含まない CH/LIF 条件で 2i/LIF 条件よりも初期化が促進される。従って、*Klf5* は EpiSC の初期化において、MEK 阻害剤に置き換わることで、GSK3 阻害と協調して naïve 状態への初期化を促進している。この様に、初期発生、多能性幹細胞の維持と初期化において、*Klf5* は Fgf-ERK 経路の抑制により多能性幹細胞の発生と維持を保障していると考えられる。

表 1

a					b				
Derivation of ESCs from MEKi-treated embryos					Development of MEKi-treated embryos				
embryos	ES Cells	WT	+/-	<i>Klf5</i> KO		WT	+/-	<i>Klf5</i> KO	empty decidua
92	60	16	37	7	7.5 dpc	17	23	0	6

表 1. MEK を阻害した *Klf5* KO 胚の発生能

(a) E2.5 から MEK 阻害剤存在下で 24 時間培養して得られた胚盤胞の ICM から、ES 細胞を樹立した。92 個の胚から 60 株の ES 細胞を樹立した結果、7 株が *Klf5* KO ES 細胞であった。

(b) E2.5 から MEK を阻害して発生をレスキューした *Klf5* KO 胚の *in vivo* 発生能。*Klf5* KO 胚を E2.5 から MEK 阻害剤存在下で 24 時間培養後、偽妊娠仮親雌マウスの子宮に胚移植した。E7.5 では *Klf5* KO 胚は得られなかったが、空の脱落膜が 6 個存在した。*Klf5* KO 胚は着床反応を示したものの、その後の発生を維持出来なかったものと考えられる。

List of qRT-PCR primer sequences

Gene	Primer Sequence (Forward)	Primer Sequence (Reverse)
Fgfr1	CCTCAGGAAACAGAAAACGATCT	CCCTCTAAGGCTTGAGTGGTGT
Fgfr2	ACAGCACCAGGAACCTACTTACACT	CTGTCCACTTATCAGGAAACAGTCT
Frs2	AGTGTGCCCTGCACAGACTA	AGGATGCTATGAGAGAACTGTGTTA
Fgf4	CATTCCTAGTGCTAAGGTTACAGG	GCTACAGAGTAAGACCCACATTT
Spry4	AAGACAGATGCGGACACAGG	TCCTCCCAGGTAGAAGGCTC
Dusp2	TTGACTGACTCCTGGGGGAA	ATGCCACCTCAGAAGAGCAC
Dusp4	GATAGAGTGGTTTCTTCCCACTTG	AGTTCATCTTCAGTGATCTGGTTCT
Dusp6	TGTCTCTAGATCCAGCAATAGGTTT	CATACAAGGCCTTAAAGAACAGATG
Dusp7	AGTCTGATTTCCAGCAGGC	GGTAGGAGGGCAGACAACAC
Sox17	CAGTATCTGCCCTTTGTGTATAAGC	GTAGTTGCAATAGTAGACCGCTGAG
Oct3/4	TATTGAGTATTCCCAACGAGAAGAG	CTCAGGAAAAGGGACTGAGTAGAGT
Nanog	CTTTCACCTATTAAGGTGCTTGC	TGGCATCGGTTTCATCATGGTAC
Sox2	CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG	CCAACGATATCAACCTGCATGG
Cdx2	CACTTTAGTCGATACATCACCATCA	CTGCTTCTTCTTGATTTTCCTCTC
Klf2	TCGAGGCTAGATGCCTTGTGA	AAACGAAGCAGGCGGCAGA
Klf4	TACCCCTACACTGAGTCCCG	GGAAAGGAGGGTAGTTGGGC
Klf5	CGATTCACAACCCAAATTTACC	GTATGAGTCCTCAGGTGAGCTTTTA
Gata6	ACTGAAGTAAGAAGAGATGGGCTTT	ATCTCTCAATCTTCCTTAGCAGACA
Esrrb	ATGAATGTGAGATCACCAAACG	G TTCAGGTAGGGGCTGTTCTC
Fgf5	ACCCACTTCCTACCCAGGTT	AGTTGTTTCCCAACAAGGCCA
T	CATGTACTCTTTCTTGCTGGACTTC	GAGCTTGTTGGTGAGTTTGACTTT
Stella	AGGCTCGAAGGAAATGAGTTTG	TCCTAATTCTTCCCGATTTTCG
Rex1	TCCATGGCATAGTTCCAACAG	TAACTGATTTTCTGCCGTATGC
$\beta$ -actin	CTGAGCGCAAGTACTCTGTGTG	GTGTAAAACGCAGCTCAGTAACAGT